

Aus dem Pathologischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktion: Prof. Dr. Thomas Kirchner

Anwendung eines neuen Tumorgraduierungssystems bei Ovarialkarzinomen
und Überprüfung der molekularen Relevanz:

Retrospektive Untersuchung an einem großen Patientenkollektiv
mit Korrelation zu klinischen Daten sowie zum Überleben

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Sebastian Franz Hartmann

Aus
Neumarkt i. d. Opf.
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatlerin: Prof. Dr. Doris Mayr

Mitberichterstatler: Priv. Doz. Dr. Ursula Zimmer-Strobl
Prof. Dr. Björn Lampe

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2015

Meinem Bruder.

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
1.1	Epidemiologie.....	3
1.2	Ursachen und Risikofaktoren	5
1.3	Früherkennung, Vorbeugung und Symptome.....	6
1.4	Diagnostik.....	7
1.5	Therapie und Prognose	7
2.	Pathologie.....	10
2.1	Pathogenese	10
2.2	Histologische Klassifikation	12
2.3	Historie der unterschiedlichen Graduierungssysteme.....	15
2.3.1	J. P. Baak	15
2.3.2	P. Bichel und A. Jakobsen	16
2.3.3	H. Haapasalo.....	17
2.3.4	J. P. und H. E. Geisler.....	17
2.3.5	Y. Shimizu und S. G. Silverberg (SSG)	18
2.3.6	A. Malpica (MDACC)	23
2.3.7	WHO/FIGO/GOG.....	24
2.4	Zielsetzung und Fragestellung	25
3.	Methoden und Material	26
3.1	Graduierung nach Malpica	26
3.1.1	Patientenkollektiv	26
3.1.2	Graduierung	27
3.2	Kras und braf Mutationsanalysen	32
3.2.1	Patientenkollektiv	32
3.2.2	Isolation der genomischen DNA	32
3.2.2.1	Entparaaffinierung	32
3.2.2.2	Lyse der Gewebeprobe, Bindung und Reinigung der DNA	32
3.2.3	PCR.....	33
3.2.4	Pyrosequenzierung.....	35
3.3	p53 Immunhistochemie	36

3.4	Statistische Auswertung.....	36
4.	Ergebnisse	38
4.1	Graduierung	38
4.1.1	Korrelation mit Shimizu und Silverberg (SSG).....	40
4.1.2	Korrelation mit FIGO	43
4.1.3	Korrelation mit dem Überleben	43
4.1.4	Korrelation mit dem histologischen Subtyp	45
4.1.4.1	Korrelation der serösen Karzinome	45
4.1.4.2	Korrelation der muzinösen Karzinome.....	48
4.1.4.3	Korrelation der endometrioiden Karzinome	50
4.1.4.4	Korrelation der klarzelligen Karzinome	52
4.2	Kras und braf Mutationsanalysen	53
4.3	p53 Immunhistochemie	57
5.	Diskussion	59
5.1	Diskussion der Graduierung	59
5.2	Diskussion der Tumorgenese.....	63
6.	Zusammenfassung.....	69
7.	Anhang	71
8.	Danksagung.....	73
9.	Lebenslauf	74
10.	Literaturverzeichnis.....	75

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Ovarialkarzinoms

Mit 3,5 % aller malignen Neoplasien und 5,6 % aller Krebssterbefälle ist das Ovarialkarzinom nach dem Endometriumkarzinom der zweithäufigste bösartige Tumor der weiblichen Geschlechtsorgane und zugleich einer der aggressivsten. Nach dem Mammakarzinom, Kolonkarzinom, Bronchialkarzinom und dem Uteruskarzinom folgt das Ovarialkarzinom auf Platz fünf der Inzidenzen maligner Erkrankungen in Deutschland. Betrachtet man die Mortalität dieser Erkrankung, so belegen maligne Ovarialtumore nach Brustkrebs, Darmkrebs, Bronchialkarzinom und dem Pankreaskarzinom ebenfalls Platz fünf. Bei über 90 % der bösartigen Veränderungen im Ovar handelt es sich um Adenokarzinome.

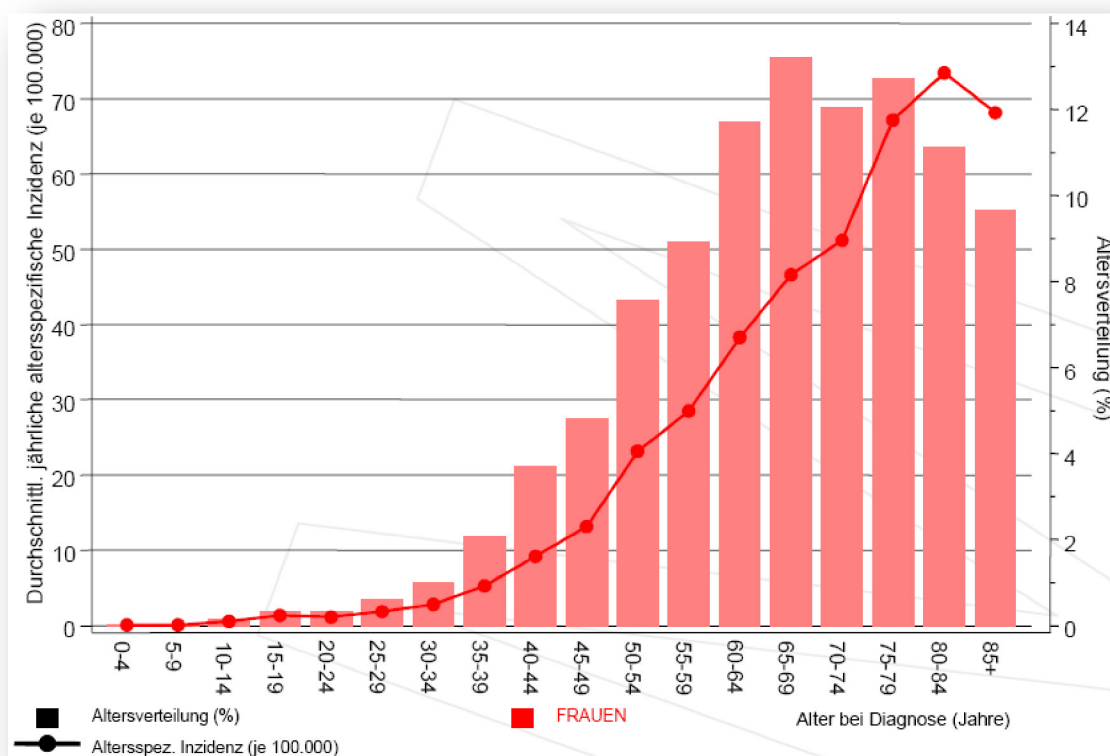
In Deutschland erkranken jährlich etwa 8000 Frauen pro Jahr (Stand 2008), seit den 1990er Jahren ist die Anzahl jedoch rückläufig. Die Ursache hierfür scheint der protektive Effekt der hormonellen Ovulationshemmer zu sein. 2012 sind nur noch 7200 Neuerkrankungen aufgetreten. Die Mortalität hingegen bleibt weiterhin hoch, das relative 5-Jahres-Überleben beträgt nur ca. 40 %.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren; die Wahrscheinlichkeit, als Frau einmal Eierstockkrebs als Diagnose zu erhalten, beträgt 1,5 %. Die Häufigkeiten bei der Altersverteilung und die altersspezifische Inzidenz zeigt Abbildung 1.

Weltweit beträgt nach Angaben der WHO die Inzidenz ca. 200.000 Frauen pro Jahr, die an malignen Ovarialtumoren erkranken. Die Zahlen variieren jedoch stark nach Kontinenten, in besser entwickelten Ländern sind die Anzahl und somit auch die krebsbedingte Mortalität im Vergleich zu weniger entwickelten Ländern deutlich erhöht (Kreienberg 2009).

Im europäischen Vergleich liegt Deutschland bei Neuerkrankungen deutlich hinter den Nationen Tschechien und England zurück (Robert Koch Institut 2012).

Abbildung 1: Altersverteilung und altersspezifische Inzidenz beim malignen Ovarialtumor von 2008-2011, n = 5246 (Tumorregister München 2013)



1.2 Ursachen und Risikofaktoren

Das Risiko für ein Ovarialkarzinom erhöht sich durch das zunehmende Alter der Frau, Übergewicht, Infertilität, Kinderlosigkeit, eine postmenopausale Hormonersatztherapie, Endometriose, ethnische Unterschiede (weiße Hautfarbe), eine frühe erste Regelblutung sowie ein spätes Einsetzen der Wechseljahre. Die Ursache vieler dieser Risikofaktoren liegt an der erhöhten Anzahl an ovulatorischen Zyklen. Ob Umweltfaktoren wie das Rauchen zu einem erhöhten Risiko führen wird kontrovers diskutiert. In einigen Studien wird eine Assoziation zu muzinösen Ovarialkarzinomen unterstellt (Pan, Ugnat et al. 2004).

Bei etwa zehn Prozent aller Ovarialkarzinome kann man ein gehäuftes familiäres Auftreten mit einer genetischen Komponente beobachten. Sind Verwandte ersten Grades an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt bzw. haben die Frauen selbst Brust- (BRCA1/2, BReast CAncer gene 1/2), Darm- bzw. Gebärmutterkörperkrebs (HNPCC, Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) oder andere Tumoren, z.B. im Rahmen eines Li-Fraumeni-Syndroms, ist dies ebenfalls als ein erhöhtes Risiko zu sehen. Meist werden diese Frauen bereits in jungem Alter vorstellig, insbesondere bei Brust- und Darmkrebs. Die mit etwa 90 % am häufigsten betroffenen Gene sind die Brustkrebsgene BRCA1 und BRCA2, Keimbahnmutationen erhöhen das Lebenszeitrisiko für ein Ovarialkarzinom um das drei- bis 50-fache. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl Deletionen, Insertionen, Basensubstitutionen sowie Mutationen in regulatorischen Abschnitten über die gesamte Sequenz verteilt auftreten können, ist es wichtig das gesamte Gen zu sequenzieren.

Da für Patientinnen mit BRCA 1 Mutation das Ovarialkarzinomrisiko ab 40 Jahren stark ansteigt, ist es wichtig, diese Patientinnen frühzeitig über prophylaktische Operationen aufzuklären.

Gehäuft kann man auch bei Frauen aus Familien mit hereditären nichtpolypösen Darmkarzinomen Ovarialkarzinome und Endometriumkarzinome beobachten. Hier liegt eine Mutation im Mismatch-Repair-Gen vor.

Keimbahnmutationen in p53 (humanes Tumorsuppressor-Gen) machen nur einen sehr kleinen Anteil der hereditären Ovarialkarzinome aus (weniger als ein Prozent), bekanntester Vertreter ist das Li-Fraumeni-Syndrom, eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung. Diese Familien weisen ein heterogenes Bild an Tumoren auf (Osteo- und Weichteilsarkome, Gehirntumoren, Leukämien, Mamma-, Lungen-, Prostata-, Pankreas-, Kolon- und Ovarialkarzinome), die meist bereits sehr früh auftreten.

Schwangerschaften sowie die Einnahme von hormonellen Ovulationshemmern schützen hingegen vor Eierstockkrebs. Je mehr Kinder eine Frau gebärt, desto größer ist auch die Risikoreduktion. Man geht davon aus, dass eine Schwangerschaft das Risiko um etwa 25 - 50 % reduziert. Stillen hingegen scheint das Risiko nur in begrenztem Ausmaß zu senken. In kinderreichen Bevölkerungsgruppen, wie z.B. bei den Mormonen, tritt das Ovarialkarzinom deutlich seltener auf. Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva senkt das Risiko um 35 % und kann bei längerer Einnahme sogar das Erkrankungsrisiko auf das gleiche Niveau einer gebärenden Frau reduzieren. Bereits bei einer kurzen Einnahme von einem halben Jahr hält der schützende Effekt 15 Jahre an. Tubenligaturen sowie Hysterektomie mit Adnektomie führen ebenfalls zu einem niedrigeren Risiko. Ob bestimmte Ernährungsweisen zu einem erhöhten bzw. erniedrigten Risiko führen können, ist noch unklar (Schmalfeldt 2007, Kreienberg 2009, Yang, Trabert et al. 2011, Robert Koch Institut 2012).

1.3 Früherkennung, Vorbeugung und Symptome

Ovarialkarzinome werden häufig aufgrund ihrer fehlenden Frühsymptomatik relativ spät oder nur zufällig bei Routineuntersuchungen erkannt. Da aber die Mortalität mit zunehmendem Krankheitsstadium bei Diagnose zunimmt, wäre es wichtig diese Krebsart frühzeitig erkennen zu können. Die Beschwerden sind jedoch oft uncharakteristisch und gehen mit unspezifischen gastrointestinalen Symptomen (Völlegefühl, Harn-/ bzw. Darmtätigkeitsstörungen), uterinen Blutungen oder diffusen Schmerzen einher. Erst die zunehmende Größe des Tumors oder Aszites und dadurch bedingte Zunahme des Leibesumfangs veranlassen die Patientinnen einen Arzt aufzusuchen.

Um den Krebs frühzeitig zu erkennen, wird standardmäßig bei der Krebsvorsorgeuntersuchung sowohl eine abdominale als auch eine vaginale Sonographie durchgeführt. Insbesondere der transvaginale Ultraschall kann helfen, kleine Prozesse am Ovar bereits frühzeitig darstellen zu können und zwischen zystischen und soliden Tumoren unterscheiden zu können. Da aber 95 % der festgestellten Veränderungen am Ovar physiologisch sind und keiner operativen Abklärung bedürfen, ist die Gefahr, Frauen mit physiologischen Veränderungen fälschlicherweise einer großen Operation zu unterziehen, groß (Diedrich 2007).

1.4 Diagnostik

Die Diagnostik setzt sich aus der bimanuellen Tastuntersuchung, der Vaginalsonographie und der Abdominalsonographie zusammen. Eventuelle Zysten werden nach ihrer Größe, Wanddicke, Septen, Blutfluss und soliden Tumoranteile beurteilt. Der Tumormarker CA-125 dient lediglich als Verlaufsparemeter und nicht der Tumorfrüherkennung (Diedrich 2007, Schmalfeldt 2007).

Da er aber bei 80 % der Ovarialkarzinompatientinnen erhöht ist, ist er als Screeningparemeter sehr verbreitet. Während die Sensitivität hoch ist, so ist die Spezifität doch gering. CA-125 kann auch bei anderen Krebserkrankungen, wie z.B. dem Endometrium-, Bronchial-, Mamma- oder Pankreaskarzinom, erhöht sein. Benigne Erkrankungen wie die Endometriose, der Uterus myomatosus, die Leberzirrhose, eine Adnexitis, Aszites oder ein Pleuraerguss können ebenfalls zu erhöhten CA-125 Spiegeln führen. Dies scheint auch der Grund zu sein, weshalb bei ca. einem Prozent aller gesunden Frauen physiologisch erhöhte Serumkonzentrationen gemessen werden. Die Spezifität kann erhöht werden, in dem man den Verlauf kontrolliert und Anstiegsraten berücksichtigt. Zurzeit gibt es keine routinemäßige Ovarialkarzinomscreeninguntersuchung bei Frauen mit normalem Ovarialkarzinomrisiko (Kreienberg 2009).

1.5 Therapie und Prognose

Wird der Verdacht auf einen malignen Prozess in den Ovarien gestellt, muss zunächst nach einem allgemeinen Staging (z.B. Ultraschall Abdomen mit Leber) eine sogenannte Staginglaparatomie durchgeführt werden, in der die Tumorausbreitung im Abdomen und die Diagnosesicherung im Vordergrund stehen. Durch Festlegung des Tumorstadiums (FIGO/TNM, siehe 2.2 Histologische Klassifikation) kann über Prognose und Therapiemöglichkeiten entschieden werden. Zudem besteht die Möglichkeit, Peritonealflüssigkeit auf Tumorzellen oder Lymphknoten auf Metastasierung hin zu untersuchen. Die Metastasierung erfolgt vorwiegend über die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten, selten hämatogen in Leber und Lunge. Implantationsmetastasen können sich früh durch zirkulierende Tumorzellen mit der Peritonealflüssigkeit in der Bauchhöhle ausbreiten (Kreienberg 2009).

Bei der Primäroperation steht die radikale operative Tumorentfernung zunächst im Vordergrund. Ziel sollte eine R0-Resektion ohne makroskopisch nachweisbaren Tumorrest

sein, oft ist hierzu eine Darmteilresektion notwendig. Zur Verbesserung der Prognose ist ebenfalls eine Resektion von Metastasen in anderen Organen anzustreben.

Grundsätzlich besteht diese zytoreduktive Behandlung aus einer Hysterektomie und beidseitigen Adnexektomie, einer systematischen paraaortalen/pelvinen Lymphonodektomie und einer Omentektomie.

Fast alle Patientinnen erhalten zusätzlich zu der Primäroperation eine aggressive adjuvante Chemotherapie mit Platin oder Taxan, abhängig von der Chemotherapieempfindlichkeit und Biologie des individuellen Karzinoms. Der Erfolg der Chemotherapie ist im Wesentlichen von der Tumorbiologie abhängig. Eine Strahlentherapie wird heute eher selten durchgeführt und gehört nicht mehr zu der Standardtherapie, da einerseits kein verbesserter Outcome bezüglich einer Therapie mit Platin gezeigt werden konnte und andererseits die Nebenwirkungen (großes Strahlenfeld) hoch sind. Hormontherapien finden ebenfalls nur noch in seltenen speziellen Fällen Anwendung.

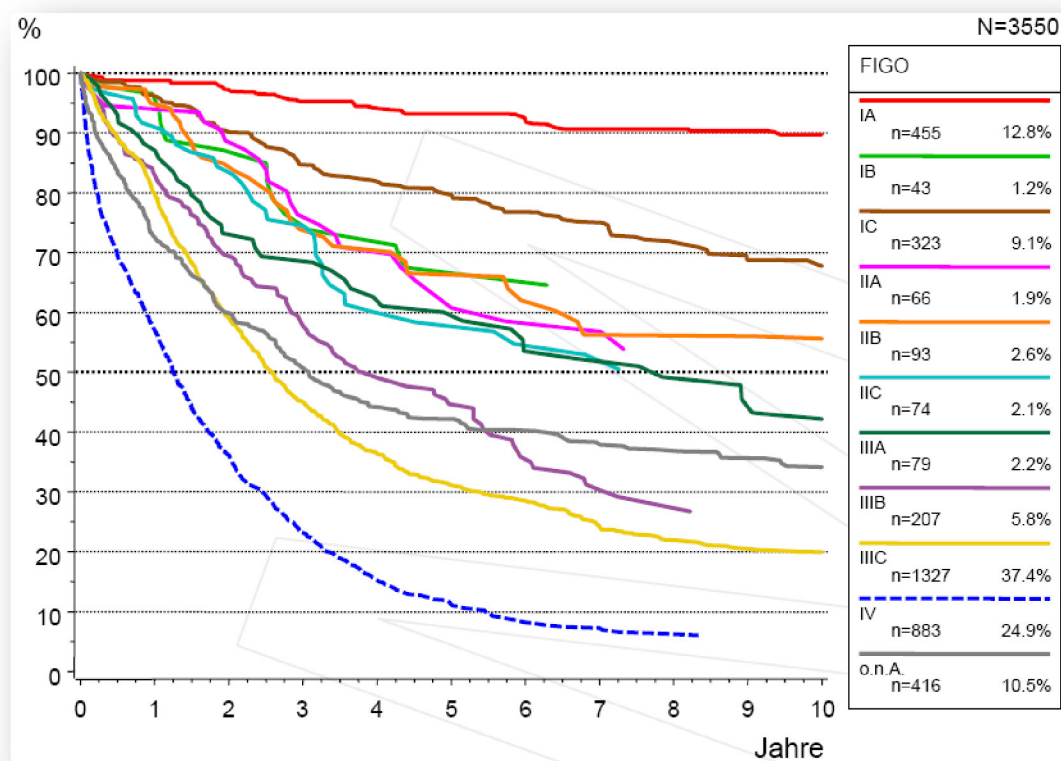
Eine Ausnahme stellen gesunde Patientinnen mit BRCA 1 und 2 Mutationen dar. Ihnen wird, sofern sie nachgewiesen die Mutation besitzen, ab einem Alter von 36 Jahren bei abgeschlossenem Kinderwunsch die Empfehlung zur prophylaktischen Ovariectomie ausgesprochen.

30 % der Ovarialkarzinome werden im FIGO Stadium I oder II (siehe 2.2 Histologische Klassifikation) diagnostiziert. Da der Tumor auf das kleine Becken begrenzt ist, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei diesen Patientinnen stadienabhängig 65 - 90 %. Ein Drittel der betroffenen Frauen kann durch die Therapie geheilt werden.

Das Überleben im FIGO Stadium III/IV korreliert mit dem größten Durchmesser des postoperativ verbliebenen Tumorrests; ebenfalls von Bedeutung sind der Lymphknotenstatus, das Alter der Patientin und die vorhandene Aszitesmenge. Da die Diagnose hier oft spät gestellt wird, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate in diesen fortgeschrittenen Stadien nur noch bei etwa 40 %. Nicht therapierbare Ileusproblematik führt häufig zum Tod (Kaufmann 2006, Diedrich 2007).

Abbildung 2 zeigt das relative Überleben für Patientinnen mit einem malignen Ovarialtumor nach ihrem FIGO Stadium. Je höher das FIGO Stadium bei Diagnose ist, desto kürzer ist im Durchschnitt das relative Überleben.

Abbildung 2: Relatives Überleben für Patientinnen mit Ovarialtumor nach FIGO Stadium, n = 3550 (Tumorregister München 2013)



2. Pathologie

Ovarialkarzinome stellen sich sehr heterogen dar. Aufgrund des histogenetisch vielfältig differenzierten Organaufbaus ist die Morphologie und Biologie der verschiedenen Tumortypen breit gefächert.

Etwa 65 - 75 Prozent aller Ovarialgeschwülste sind epitheliale Tumoren, davon stellen die serösen Tumore die größte Gruppe. 15 - 20 Prozent der Ovarialtumoren sind Keimzelltumoren, 5 - 10 Prozent Keimstrang-Stroma-Tumoren und ca. fünf Prozent Ovarialmetastasen (Bässler 1997).

2.1 Pathogenese

Die Tatsache, dass Ovarialkarzinome auch heute noch zu den gynäkologischen Erkrankungen mit einer extrem hohen Mortalität gehören, liegt einerseits an den bereits erwähnten fehlenden Screeningmöglichkeiten und dem damit in der Regel hohem Tumorstadium bei Erstdiagnose, andererseits zu einem großen Teil daran, dass man noch wenig über den „Ausgangspunkt“ und die Pathogenese des malignen epithelialen Ovarialtumors weiß.

Durch die in der Zwischenzeit möglichen molekularen Untersuchungen hat sich in den letzten Jahrzehnten die Theorie entwickelt, dass es zwei verschiedene Typen von Ovarialkarzinomen gibt, die sich sowohl morphologisch als auch molekular voneinander unterscheiden. Man spricht von einem dualen Pathogeneseweg.

Low-grade seröse, low-grade endometrioid, klarzellige und muzinöse Karzinome fallen unter Typ I Tumoren; sie sind meist klinisch indolent und bei Erstvorstellung noch in niedrigen Stadien, wohingegen Typ II Tumoren ein aggressives Wachstum aufweisen und bereits bei der Erstvorstellung in fortgeschrittenem Stadium sind. Zu dieser Gruppe gehören high-grade seröse, high-grade endometrioid und undifferenzierte Karzinome des Ovars. Die Einteilung in low- und high-grade Karzinome basiert auf einem von Anais Malpica 2004 entwickelten Systems, das im Absatz 2.3.6 detaillierter erläutert wird. (Shih Ie and Kurman 2004, O'Neill, Deavers et al. 2005, Kurman and Shih Ie 2010).

Low-grade seröse Ovarialkarzinome (OSC), die nur etwa 25 % ausmachen und somit deutlich seltener vorkommen als high-grade OSC, entstehen meist stufenweise aus einem gutartigem Zystadenom, das sich über einen Borderlinetumor, manchmal über einen mikropapillär strukturierten Borderlinetumor schließlich zu einem invasiven low-grade Karzinom entwickelt. Borderlinetumoren weisen zwar atypische Proliferate auf, zeigen

jedoch keine Stromainvasion. Diese stufenartige Entstehung des Karzinoms erinnert an die Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms (McCluggage 2008).

Bei zwei Drittel aller serösen low-grade Karzinome findet man eine *kras*, *braf* oder *ERBB2* Mutation, jedoch kaum *TP53* Mutationen. (Kurman and Shih 2010). *Kras* und *braf* gehören zur Gruppe der Onkogene, die im Falle einer Mutation über die Ras-Map-Kinase-Signalkaskade zur Proliferation des Tumors beitragen. *ERBB2* ist eine Rezeptortyrosinkinase, die ebenfalls über den Ras-Map-Kinase-Weg die Zellproliferation fördert und die Apoptose hemmt. *TP53* hingegen gehört zu einer Reihe von Tumorsuppressorgenen, die im Tumorgewebe inaktiviert werden (Kreienberg 2009).

Obwohl auch viele low-grade Ovarialkarzinome tödlich verlaufen, so ist doch das Überleben aufgrund des verlangsamten und weniger aggressiven Wachstums deutlich verlängert. Die Patientinnen sind zudem bei der Erstdiagnose jünger. Allerdings sprechen sie, im Gegensatz zu high-grade Karzinomen, nicht auf eine Chemotherapie mit Platin an (Gershenson, Sun et al. 2006).

Über den Ursprung von high-grade Karzinomen ist man sich in der Literatur noch unschlüssig.

Früher glaubte man, dass high-grade OSC entweder direkt aus sog. Vorläuferläsionen des ovarialen Oberflächenepithels (Mesothelium) oder vom Epithel der kortikalen Inklusionszysten entspringen (McCluggage 2008). Man vermutete, dass diese Vorläuferläsionen intraepitheliale Neoplasien sind, die sich als atypisches Epithel in den Zysten oder auf der Oberfläche manifestieren (Feeley and Wells 2001).

Es sind aber auch einige Fälle bekannt, in welchen atypisch seröse Borderlinetumore sich zu serösen high-grade Ovarialkarzinomen entwickelten (Dehari, Kurman et al. 2007).

Einen Wechsel in der Denkweise bewirkte eine Studie die zeigte, dass bei Frauen mit familiären *BRCA1* oder *BRCA2* Mutationen high-grade OSC auf Basis eines bestehenden intraepithelialen Tubenkarzinoms entstehen können. Hierbei wurden die Eileiter und Eierstöcke von *BRCA* positiven Patientinnen untersucht, die sich prophylaktisch einer Salpingo-Oophorektomie unterzogen hatten (Kindelberger, Lee et al. 2007).

In darauffolgenden Studien konzentrierte man sich darauf, den Ursprung des Ovarialkarzinoms nicht im Ovar selbst zu suchen, sondern im Eileiter. Man stellte fest, dass bei einem Teil der Patientinnen mit nicht-erblichen high-grade OSC in der Tubenmukosa ein nicht-invasives Tubenkarzinom (serous tubal intraepithelial carcinoma, STIC) nachgewiesen werden kann.

Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass STICs, die meistens in der Fimbria ovarii und/oder in distalen Tubenabschnitten auftreten, der Ursprung des high-grade OSC sowohl bei Frauen mit erblicher Vorbelastung als auch bei Frauen ohne BRCA Mutation sind.

Die Tatsache, dass sowohl STICs als auch viele der high-grade OSC TP53 Mutationen (oft sogar identisch) aufweisen, spricht ebenfalls für diese Theorie.

Kann diese Beobachtung in weiteren Studien bestätigt werden, so hätte dies Auswirkungen auf die Behandlung, Frühuntersuchung, Prävention und Forschung des Ovarialkarzinoms (Kurman and Shih 2010).

Muzinöse Ovarialkarzinome entwickeln sich meist aus muzinösen Borderlinetumoren, endometrioiden Tumoren entstehen aufgrund von Endometriose oder bereits existierenden Adenofibromen oder Borderlinetumoren und man geht heute davon aus, dass klarzellige Tumore ebenfalls auf Endometriose basieren (McCluggage 2008).

2.2 Histologische Klassifikation

Ovarialtumore werden, wie alle anderen Karzinome auch, nach international festgelegten Kriterien klassifiziert (FIGO, TNM System), siehe Tabelle 1. Während die meist in Europa angewandte FIGO Klassifikation mehr im klinischen Alltag verwendet wird, ist die international gebräuchliche TNM Klassifikation eher klassisch pathologisch.

Gemäß den drei verschiedenen Gewebekomponenten im Ovar (Deck- bzw. Müller-Oberflächenepithel, gonadal oder sexuell differenzierte Stroma, Keimzellen) teilt die Klassifikation der WHO von Serov und Scully Ovarialtumoren in drei Hauptgruppen ein: epitheliale Tumoren, Keimstrang-Stroma-Tumoren und Keimzelltumoren. Jede Gruppe besitzt viele Untergruppen, sie alle basieren grundsätzlich auf der WHO Klassifikation von 1973. Diese Klassifikation gilt für alle Karzinome, für einen Teil der nicht-epithelialen Tumoren und beim Ovar auch für Borderlinetumoren, die analog den invasiven Karzinomen klassifiziert werden (Bässler 1997).

Dabei gibt es eine klinische Klassifikation anhand der Befunde (klinisch, radiologisch, intraoperativ) mit dem Präfix „c“ sowie eine pathologische Klassifikation mit dem Präfix „p“.

Der Differenzierungsgrad, d.h. das Ausmaß der Abweichung vom normalen Gewebe, lässt sich folgendermaßen darstellen:

GX	Differenzierungsgrad nicht beurteilbar
GB	Borderline-Malignität
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3-4	Schlecht differenziert/undifferenziert

Als regionäre Lymphknoten definiert man die Lymphknoten an den Aa. iliacae internae (hypogastrische, einschließlich Obturatoriallymphknoten), communes und externae, sowie lateral-sakrale, paraaortale und inguinale Lymphknoten (Diedrich 2007).

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms, nach (Diedrich 2007)

FIGO	TNM	
	TX	<i>Primärtumor kann nicht beurteilt werden</i>
	T0	<i>Kein Anhalt für Primärtumor</i>
Stadium 0	Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
Stadium I	T1	<i>Tumor begrenzt auf Ovarien</i>
Stadium Ia	T1aN0M0	<i>Tumor auf ein Ovar begrenzt. Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars, keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung</i>
Stadium Ib	T1bN0M0	<i>Tumor auf beide Ovarien begrenzt. Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien, keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung</i>
Stadium Ic	T1cN0M0	<i>Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur. Tumor an der Ovaroberfläche oder maligne Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung</i>
Stadium II	T2	<i>Tumor befällt ein Ovar oder beide und breitet sich im Becken aus</i>
Stadium IIa	T2aN0M0	<i>Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n), keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung</i>
Stadium IIb	T2bN0M0	<i>Ausbreitung auf andere Beckenorgane, keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung</i>
Stadium IIc	T2cN0M0	<i>Ausbreitung in Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung</i>
Stadium III	T3 und/oder N1/M0	<i>Tumor befällt ein oder beide Ovarien, mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen</i>
Stadium IIIa	T3aN0M0	<i>Mikroskopisch Peritonealmetastasen jenseits des Beckens</i>
Stadium IIIb	T3bN0M0	<i>Makroskopisch Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung 2cm oder weniger</i>
Stadium IIIc	T3cN0M0 Jedes TN1M0	<i>Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung mehr als 2cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen</i>
Stadium IV	Jedes T Jedes N M1	<i>Fernmetastasen</i>

2.3 Historie der unterschiedlichen Graduierungssysteme

Im Gegensatz zu anderen gynäkologischen Karzinomen, wie z.B. dem Mamma- oder Endometriumkarzinom, gibt es beim Ovarialkarzinom noch kein adäquates Graduierungssystem.

Dies liegt vor allem daran, dass man sich noch auf kein allgemein akzeptiertes histopathologisches Graduierungssystem einigen bzw. dessen Nutzen beweisen konnte. Zudem mangelte es den bisherigen Systemen auch an Einfachheit, Reproduzierbarkeit und prognostischer Bedeutung (Mayr and Diebold 2000).

In den letzten dreißig Jahren wurden viele Systeme vorgeschlagen, die jedoch alle Ansatzpunkte für Kritik bieten (Silverberg 2000):

- 1) Einige Publikationen schließen Borderlinetumoren (low malignant potential) bei Karzinomen ein; dies verbessert (fälschlicherweise) das Ergebnis der gut differenzierten Tumore G1.
- 2) Oft wird die Art und Weise der Graduierung nicht spezifiziert. Architektur und Zytologie werden unterschiedlich stark gewichtet oder es fehlt jegliche Spezifizierung.
- 3) In vielen der bisherigen Studien werden Präparate nicht nur von einem einzigen Pathologen bzw. einem Institut beurteilt, sondern von vielen.
- 4) Die Patientinnen einer Studie werden nicht alle nach einem einheitlichen Therapieschema behandelt, so dass die therapeutische und prognostische Aussagekraft gering ist.

Mehrere Studien zeigen bereits die Wichtigkeit der histologischen Graduierung und der Feststellung des histologischen Typs auf. Jedoch bemängelt Bertelsen et al. schon 1993, dass diese beiden Kriterien oft sehr subjektiv beurteilt werden und dass die Reproduzierbarkeit aufgrund interner und externer Einflüsse variiert. Alleine die Auswahl des zu klassifizierenden Gebiets kann viele Fehler beinhalten (Bertelsen, Holund et al. 1993).

Um die Schwierigkeiten besser erläutern zu können, werden kurz die wichtigsten Graduierungssysteme seit den 1980er Jahren gegenüber gestellt.

2.3.1 J. P. Baak

Baak et al. stellt 1985 in einer Studie fest, dass es zwischen verschiedenen Pathologen doch häufig zu einem unterschiedlichen Graduieren kommt (Interobserver-Variabilität). Dies veranlasst ihn, ein objektives, genau definiertes und reproduzierbares Graduierungssystem zu fordern bzw. zu entwerfen (Baak, Langley et al. 1987).

Deshalb schlägt er 1986 ein Modell vor, das als stärkste Prognosefaktoren den Mitoseaktivitätsindex und den Volumenanteil an Epithel vorsieht. Die Kernmorphometrie spielt in diesem ersten Modell eine deutlich weniger wichtige Rolle; man bemerkt jedoch, dass bei Patientinnen, die weniger als fünf Jahre überleben, häufiger irreguläre Kernformen gefunden werden (Baak, Wisse-Brekelmans et al. 1986).

Im darauffolgenden Jahr entwirft Baak ein neues System, bei dem die Entscheidungsfindung mit Hilfe eines genaueren Prozedere erleichtert werden soll. Es gliedert sich in drei Schritte auf.

Schritt 1: Man muss entscheiden, ob der Tumor in das Stroma eingedrungen ist - falls nicht, nennt man diesen Tumor Borderline. Schritt 2: Falls der Tumor in Schritt 1 als invasives Karzinom erkannt wurde, erfolgt die Graduierung nun anhand von zwei Kriterien: besitzt er solide Anteile oder hyperchromatine Riesenkerne. Tritt eines der beiden Kriterien im mikroskopischen Gesichtsfeld (40x) auf, wird der Tumor als schlecht differenziert eingestuft; Schritt 3 betrifft invasive Karzinome, die nicht unter die Kategorie schlecht differenziert fallen. Hier kann aufgrund bestimmter Wachstumsverhalten noch in mäßig und gut differenziert unterschieden werden. Mäßig differenzierte Karzinome haben ein zerebriformes Wachstumsmuster (rundes Lumen, ohne Stromainvasion). Tumoren, die gemäß den Schritten zwei und drei weder schlecht noch mäßig differenziert sind, aber in Schritt eins ein invasives Wachstum aufweisen, werden als gut differenziert bezeichnet (Baak, Chan et al. 1987).

2.3.2 P. Bichel und A. Jakobsen

Bichel und Jakobsen schlagen 1989 vor, Ovarialkarzinome anhand eines sog. „histologic grading index (HGI)“ einzustufen. Ihr System besteht aus acht verschiedenen Parametern: (a) Struktur des Tumors, (b) Polymorphismus der Kerne, (c) nukleoläre Eigenschaften, (d) Kern-Zytoplasma Verhältnis, (e) Häufigkeit der Mitosen, (f) Art der Invasion, (g) Durchdringung der Kapsel und (h) Eindringen von Gefäßen. Jedem dieser Parameter wird nach definierten Kriterien eine Punktzahl von eins bis drei zugeteilt; der HGI berechnet sich dann aus dem Mittelwert der jeweils vergebenen Punkte und nimmt Werte zwischen eins und drei an. Sie unterteilen den HGI noch in zwei Gruppen, Patientinnen mit einem $HGI \leq 2.0$ bzw. > 2.0 .

In einer Studie zeigen sie, dass der HGI bezüglich Tumorrest (ja/nein) bei einer späteren Zweitoperation und dem 5-Jahre-Überleben besser korreliert als die histologische

Graduierung allein, hier definiert als Anteil an zystischen/papillären Strukturen versus solidem Tumorgewebe (Bichel and Jakobsen 1989).

Sowohl Baaks als auch Bichels/Jakobsens Vorschläge für neue Graduierungssysteme können sich weder in den folgenden Publikationen noch in der täglichen Diagnostik richtig durchsetzen, somit beschränkt sich die Verwendung dieser Systeme auf einige wenige an der Entstehung beteiligten Institutionen (Silverberg 2000).

2.3.3 H. Haapasalo

Aufgrund der subjektiven Einflüsse bei der Festlegung des histologischen Differenzierungsgrades sehen Haapasalo et al. Anfang der 1990er Jahre die Zukunft der pathologischen Beurteilung von Ovarialkarzinomen in der Morphometrie. Unabhängige Prognosefaktoren sind laut Haapasalo neben dem klinischen Staging (FIGO) und dem M/V Index („volume-corrected mitotic index“) der nukleäre DNA Gehalt. In einer 1990 von ihm veröffentlichten Studie belegt er die Überlegenheit seines Systems gegenüber den bisher bestehenden von Czernobilsky (1977), Russel (1979) und Baak et al. (1986). Darin geht er ebenfalls auf die Wichtigkeit der Mitosen als Prognosefaktoren in Ovarialkarzinomen ein (Haapasalo, Collan et al. 1990, Haapasalo 1991).

2.3.4 J. P. und H. E. Geisler et al

Auch Geisler und sein Forschungsteam sehen 1998 die Morphometrie als ein wichtiges Prognosekriterium für die Bewertung von Ovarialkarzinomen. In ihrer Studie konzentrieren sie sich auf die Kerne der Tumorzellen, sie untersuchen deren Größe, Form und optische Dichte. Da die Auswertung über ein interaktives Computersystem läuft, sind wenig subjektive Einflüsse zu erwarten. Der Pathologe muss lediglich entscheiden, welche Kerne aus den Messungen ausgeschlossen wurden (z. B. normale epitheliale Zellkerne, Kerne von Granulozyten). Sie stellen fest, dass die Analyse der Kernformen einen unabhängigen Vorhersagewert bezüglich des Überlebens der Patientinnen darstellt (Geisler, Wiemann et al. 1998).

2.3.5 Y. Shimizu und S. G. Silverberg (SSG)

Ebenfalls 1998 publizieren Shimizu und seine Kollegen aus der Silverberg Arbeitsgruppe erstmals ein Graduierungssystem, das unkompliziert auf alle epithelialen Ovarialkarzinome anwendbar ist. Silverberg und Shimizu orientieren sich an dem „Nottingham breast cancer system“, bei dem das Architekturmuster, die Vielgestaltigkeit der Kerne und die mitotische Aktivität beurteilt wird.

Das in den histologischen Schnittpräparaten vorliegende dominante Wachstumsmuster wird im ersten Schritt ermittelt. Da glanduläre Muster vor allem bei Ovarialkarzinomen mit guter Prognose (endometrioid und muzinös) und solide Muster eher bei undifferenzierten aggressiven Tumoren auftreten, erhält eine glanduläre Morphologie einen Punkt und eine solide drei Punkte. Dazwischen liegen Tumoren mit einem papillären Muster, denen Shimizu und Silverberg zwei Punkte zuteilen.

Im zweiten Schritt werden die Kerne beurteilt. Hierzu wird auf dem Schnittpräparat das Gebiet des Tumors aufgesucht, welches in der Übersicht (low-power 4 x 10x) das größte atypische Areal aufweist. Bei einem Punkt sollten die Zellen relativ gleich geformt sein (Variation im Durchmesser $\leq 2:1$), ein niedriges Kern-Zytoplasma Verhältnis und keine Chromatin Verklumpungen oder prominente Nukleoli besitzen. Zwei Punkte werden bei unterschiedlichen Variationen in der Kerngröße (zwischen 2:1 und 4:1) und Form, erkennbaren kleinen Nukleoli und geringen Chromatin Verklumpungen vergeben; bizarre Zellen dürfen nicht vorhanden sein. Treten erhebliche Variationen in Kerngröße ($> 4:1$) und Form, ein hohes Kern-Zytoplasma Verhältnis, Chromatin Verklumpungen, eine dicke Zellmembran, große eosinophile Nukleoli und evtl. sogar bizarre Zellen auf, werden 3 Punkte vergeben.

Obwohl Shimizu und Silverberg in einer Studie zeigen konnten, dass die mitotische Aktivität zu einem gewissen Anteil mit der steigenden Grad der Kernpleomorphie korreliert und somit nicht komplett unabhängig ist, werden sie separat im dritten und letzten Schritt beurteilt.

Die Region, die am meisten Mitosen aufweist, liegt häufig in der Tumorperipherie und wird daher zur Graduierung herangezogen. Es werden nur Kerne ausgesucht, die sicher der Metaphase, Anaphase oder Telophase zugeordnet werden können; hyperchromatische und apoptotische Kerne werden ausgeschlossen.

Neun Mitosen auf zehn high-power microscopic fields (HPF) erhalten einen Punkt, 10 bis 24 Mitosen/10 HPF zwei Punkte und ≥ 25 Mitosen/10 HPF drei Punkte.

Für die finale Graduierung werden die Einzelpunktzahlen addiert: Grad 1 (gut differenziert) 3-5 Punkte, Grad 2 (mäßig differenziert) 6-7 Punkte und Grad 3 (schlecht differenziert) 8-9 Punkte. Histologische Beispiele finden sich in den Abbildungen 3-5, eine genaue Auflistung zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Zuordnung der histologischen Beispiele den Abbildungen 3 - 5

<i>Grad</i>	<i>Differenzierung</i>	<i>Punkte</i>	<i>Abbildung</i>
1	gut differenziert	3 - 5	3a, 3b
2	mäßig differenziert	6 - 7	4a, 4b
3	schlecht differenziert	8 - 9	5a, 5b

Shimizu und Silverbergs Graduierungssystem kann sowohl bei frühen als auch fortgeschrittenen Stadien und fast allen histologischen Typen des Ovarialkarzinoms angewandt werden. Einzige Ausnahme ist das klarzellige Karzinom, bei dem in vielen Studien keine klinische Signifikanz des Graduierungssystems nachgewiesen werden konnte. Jedoch stellen Shimizu und Silverberg klar, dass zusätzlich zur Graduierung auch immer der histologische Typ zu bestimmen ist, da dieser Aussagen über die Effektivität von Chemotherapien geben kann (Shimizu, Kamoi et al. 1998, Shimizu, Kamoi et al. 1998, Silverberg 2000).

In einer Studie mit 192 Patientinnen überprüfen Mayr und Diebold das System von Shimizu und Silverberg und kommen zu ähnlichen Ergebnissen. Da das System leicht und schnell zu erlernen und auf fast alle Typen von Ovarialkarzinomen anwendbar ist, kann es leicht in die Routinediagnostik integriert werden. Darüberhinaus stellen sie fest, dass mit einem noch reduzierterem System, nämlich einer Bewertung der Kerne und Mitosen, prognostisch relevante Aussagen getroffen werden können (Mayr and Diebold 2000).

Abbildung 3a: Hoch differenziertes Ovarialkarzinom (Graduierung nach Shimizu und Silverberg), 200x

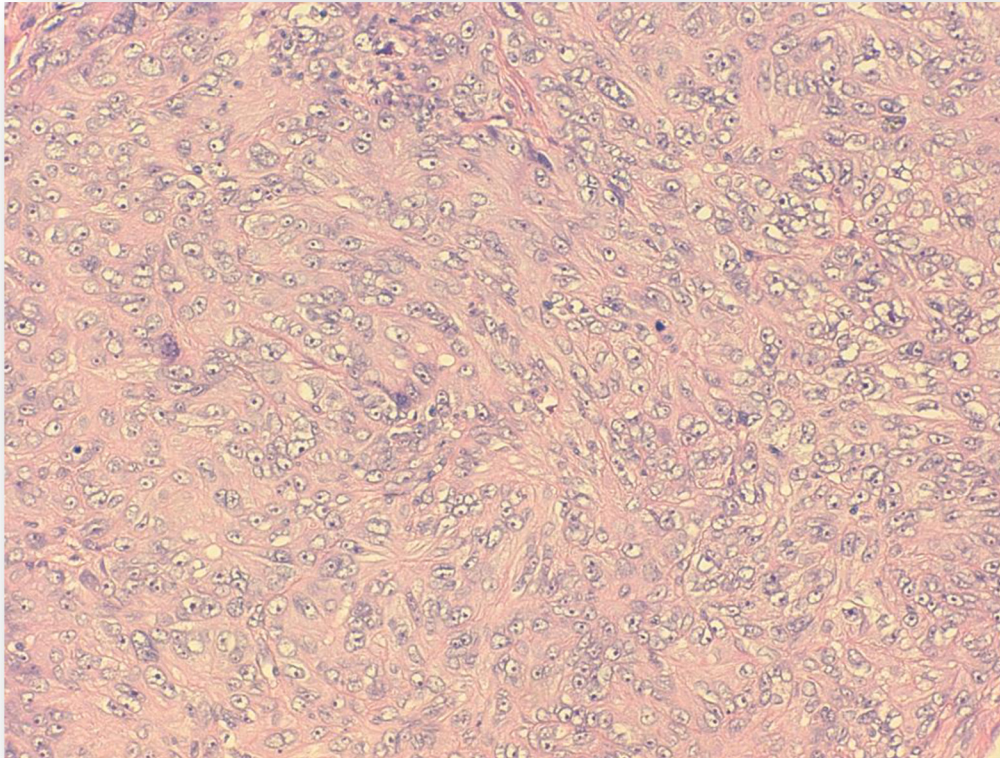


Abbildung 3b: Hoch differenziertes Ovarialkarzinom (Graduierung nach Shimizu und Silverberg), 400x

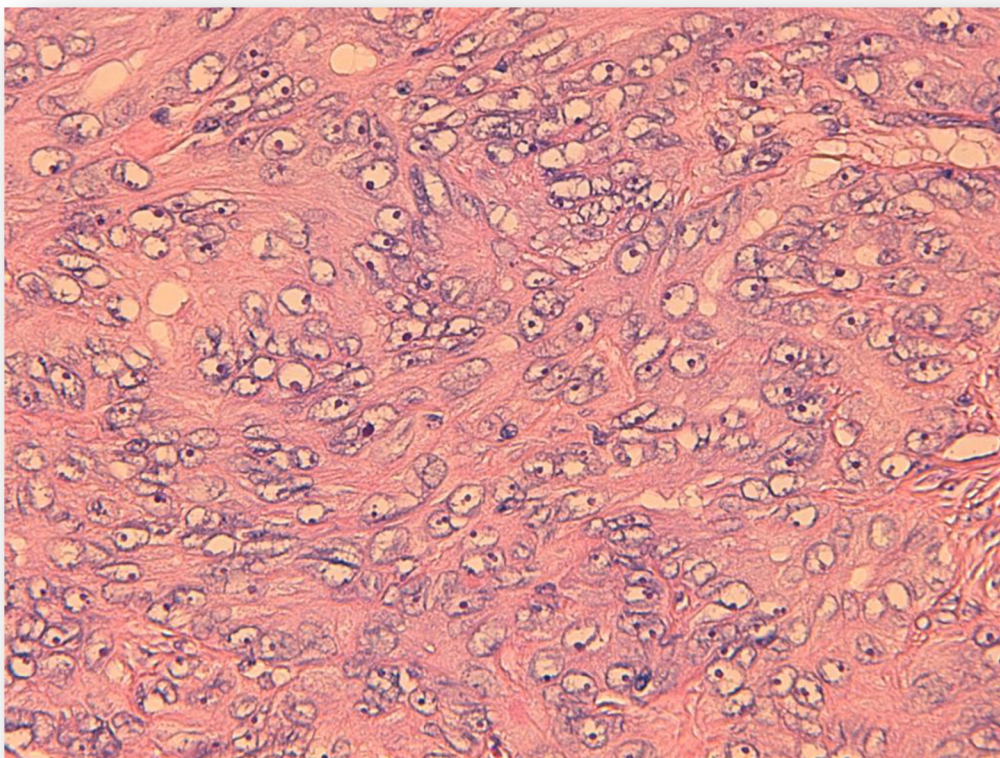


Abbildung 4a: Mäßig differenziertes Ovarialkarzinom (Graduierung nach Shimizu und Silverberg), 200x

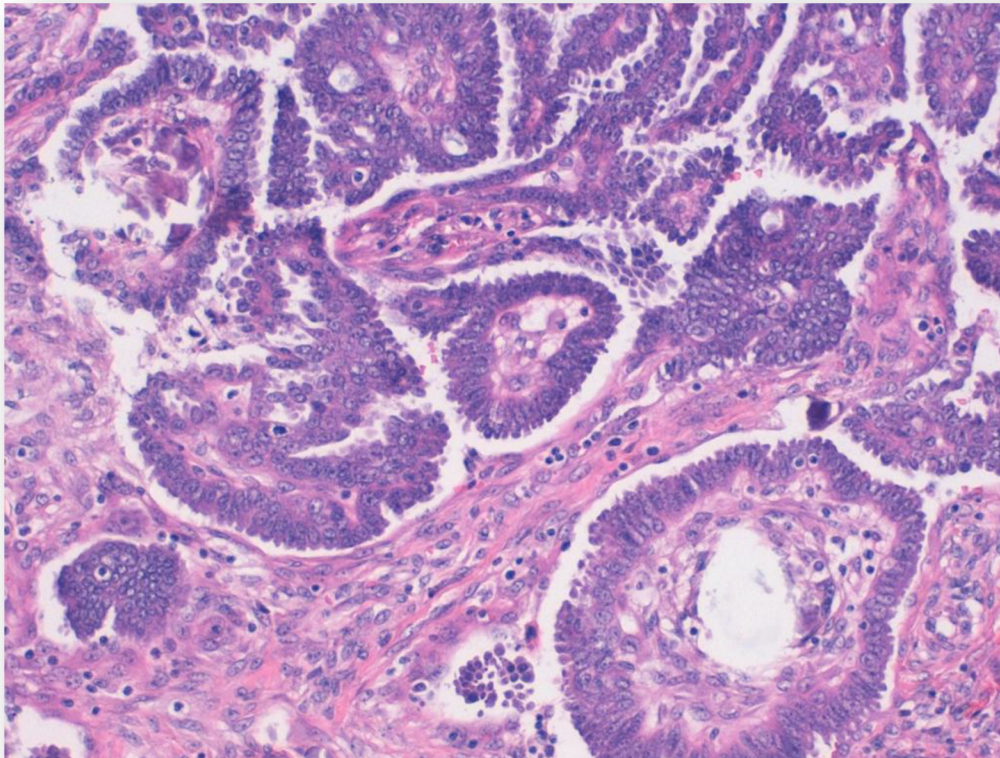


Abbildung 4b: Mäßig differenziertes Ovarialkarzinom (Graduierung nach Shimizu und Silverberg), 400x

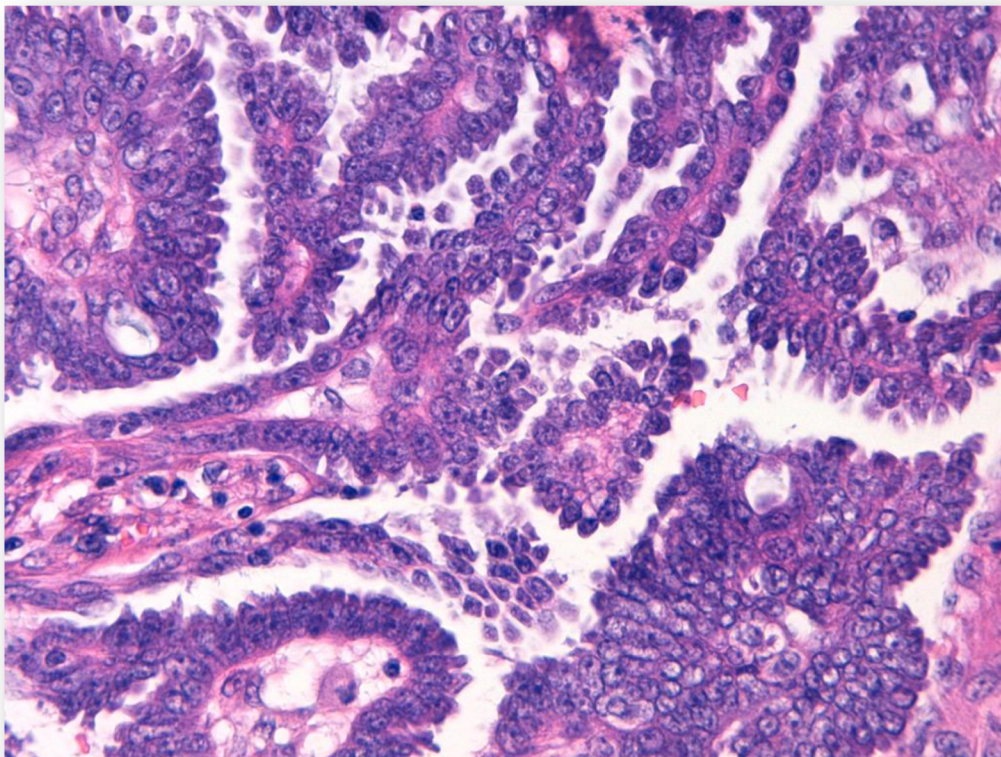


Abbildung 5a: Schlecht differenziertes Ovarialkarzinom (Graduierung nach Shimizu und Silverberg), 200x

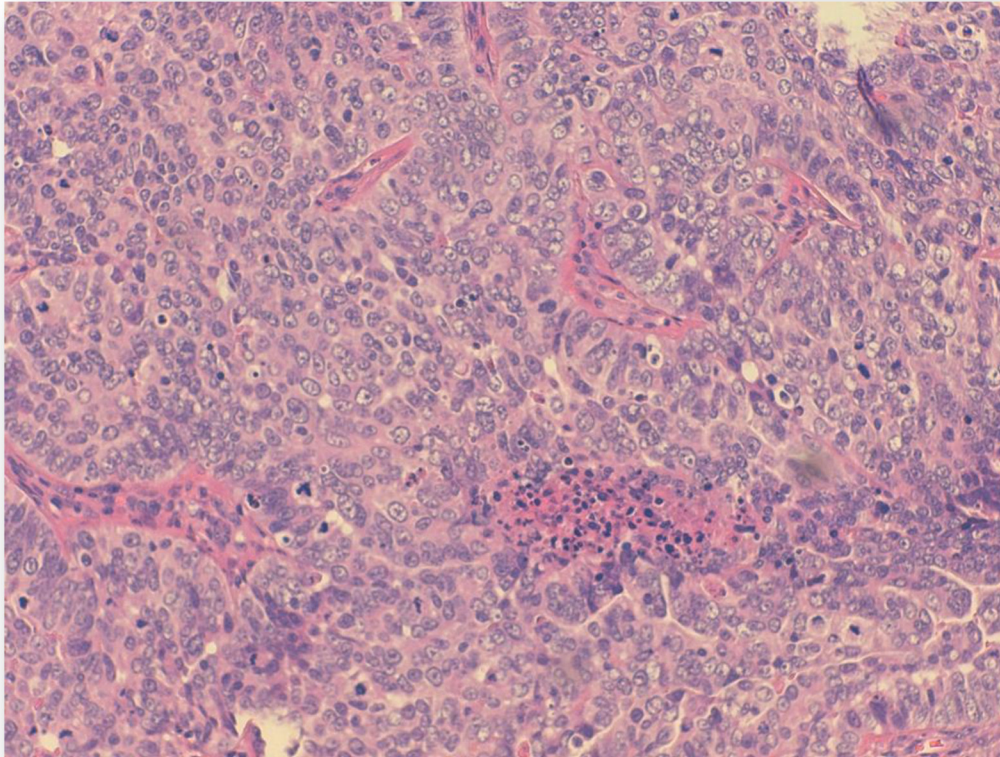
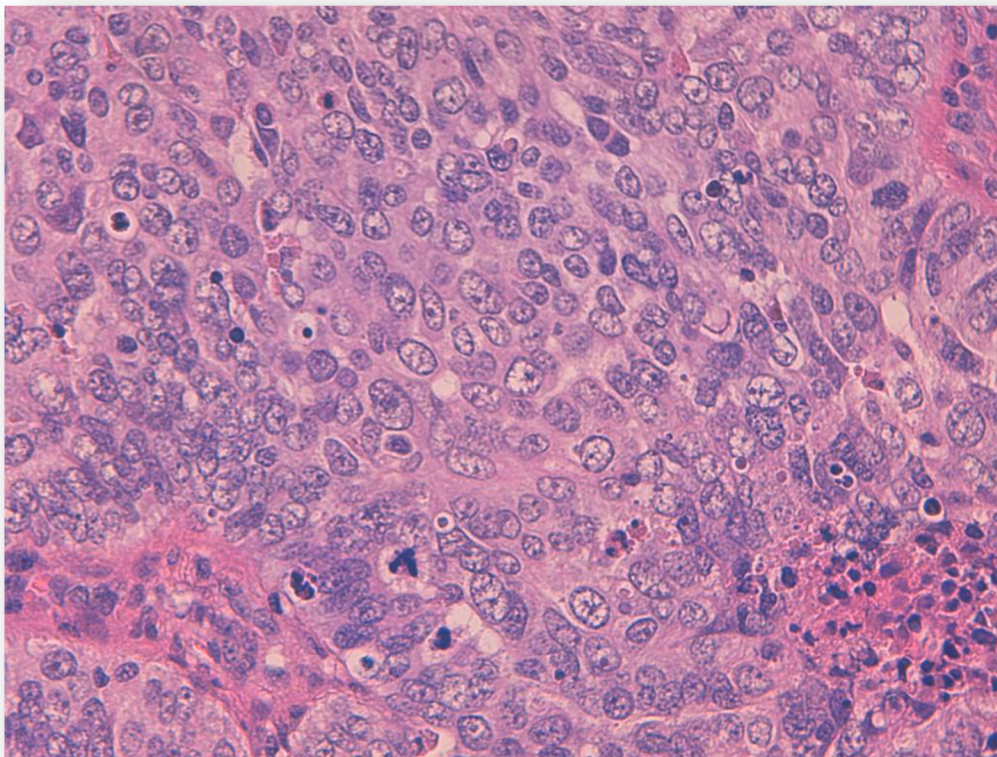


Abbildung 5b: Schlecht differenziertes Ovarialkarzinom (Graduierung nach Shimizu und Silverberg), 400x



2.3.6 A. Malpica (MDACC)

Auf den zwei Kriterien, der Zellkernpleomorphie und der mitotischen Aktivität, basiert auch das bereits 2004 von Anais Malpica vorgeschlagene Zweistufen-System.

Im ersten Schritt werden in dem am zytologisch auffälligsten Tumorareal die Kerne nach Größe und Form beurteilt. Sind die Kerne uniform, d.h. haben sie nur leichte bis mittelgradige Veränderungen und sind rund bis oval mit normaler Chromatinverteilung, werden sie als low-grade OSC (Ovarian Serous Carcinoma, seröses Ovarialkarzinom) eingestuft. Weisen die Kerne jedoch Variationen ($\geq 3:1$) in der Größe und Form auf, haben ungleichmäßig verteiltes Chromatin oder sogar Makronukleoli, bezeichnet man sie als high-grade OSC.

Im zweiten Schritt wird die Anzahl der Mitosen pro zehn HPF in der mitotisch aktivsten Region des Tumors gezählt. Low-grade Karzinome zeigen normalerweise ein – 12 Mitosen pro zehn HPF, high-grade Karzinome ≥ 13 pro zehn HPF.

Malpica zeigt, dass ihr Zweistufen-System prognostisch gut mit Shimizu/Silverberg und dem FIGO Graduierungssystem korreliert. Allerdings sieht sie ihr System im Vorteil, da es nur aus zwei genau definierten Komponenten besteht und leicht zu erlernen ist. 2007 bestätigt eine von ihr veröffentlichte Studie, dass die Ergebnisse reproduzierbar sind und auch nicht gynäkologisch spezialisierte Pathologen dieses System gut anwenden können (Malpica, Deavers et al. 2004, Malpica, Deavers et al. 2007).

2011 vergleicht ihre Forschungsgruppe noch einmal das Zweistufen-System mit dem dreistufigen FIGO System, diesmal bei Patientinnen die nach einem standardisiertem Protokoll behandelt werden. Es wird gezeigt, dass mit dem neuen System genauere Aussagen über klinische Ergebnisse wie Gesamtüberlebenszeitraum und progressionsfreies Intervall gemacht werden können. Zudem ist es leichter anzuwenden, man muss nur zwischen den zwei unterschiedlichen Tumortypen low- und high-grade unterscheiden. Aufgrund dieser Tatsachen stellt sie somit auch dieses dreistufige System in Frage.

Die von Shimizu und Silverberg klassifizierten Grad 1 Karzinome entsprechen den low-grade OSC nach Malpica, die meisten Grad 2 und Grad 3 Karzinome den high-grade OSC (Malpica 2011).

Das Zweistufen-Graduierungssystem des MD Anderson Cancer Center (MDACC) wird auch von anderen Autoren getestet. Seidman et al vergleicht an 113 Fällen (FIGO III) das binäre System seines Instituts mit dem von Malpica. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass die Graduierung mit dem Zweistufen-System des MDACC vielversprechender ist, da damit eine kleine Gruppe von bestimmten serösen Tumoren (low-

grade OSC) besser erkannt werden kann, die eine günstigere Prognose haben. Da diese Tumorart aber selten auftritt (in dieser Studie 9 %, bei Malpica 2011 8,7 %) werden weitere Studien mit einer größeren Anzahl an Probanden vorgeschlagen um genauere Aussagen über den prognostischen Wert dieses Systems treffen zu können (Seidman, Horkayne-Szakaly et al. 2006).

Auch Lawrence M. Roth glaubt, dass die Zukunft der Graduierung von Ovarialkarzinomen in der Verwendung eines einfachen und gut reproduzierbaren Systems liegt. Daher sind seiner Meinung nach das MDACC System und Silverberg/Shimizu im Vorteil. Allerdings sieht der Autor einen Vorteil für Silverberg und Shimizu, da deren System nicht auf seröse Ovarialkarzinome beschränkt ist (Roth 2007).

2.3.7 WHO/FIGO/GOG

Die auf der ganzen Welt am häufigsten verwendeten Graduierungssysteme für epitheliale Ovarialkarzinome sind das der FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) und der WHO (World Health Organization).

Obwohl die WHO und FIGO eigene Graduierungssysteme haben, sind sie nicht in ihr Stagingssystem mit einbezogen.

Das FIGO System basiert auf architektonischen Merkmalen. Die Zuordnung (Grad) hängt vom Verhältnis glandulärer/papillärer Strukturen gegenüber soliden Tumorwachstums innerhalb eines Tumors ab. Grad 1 entspricht <5 % solides Tumorwachstum, Grad 2 entspricht 5-50 % und Grad 3 entspricht >50 % solides Wachstum.

Das WHO System beurteilt architektonische und zytologische Merkmale, eine aktuelle WHO-Klassifikation ist 2014 erschienen (Longacre, Wells 2014).

In weiten Teilen Amerikas wird das System der Gynecologic Oncology Group (GOG) verwendet, das von dem histologischen Typ, zytologischen Merkmalen und dem Wachstumsmuster des Tumors abhängt. Klarzellige Karzinome können nach diesem System nicht beurteilt werden, Grad 0 entspricht dem jeweiligen Borderlinetumor. Beim Differenzierungsgrad 1 müssen eine eindeutige Stromainvasion, gut zu erkennende Papillen und drüsige Strukturen, weniger als 5 % solides Tumorwachstum und eine minimale Kernpleomorphie/Hyperchromasie gegeben sein. Bei Grad 2 sind die papillären/drüsigen Strukturen komplexer, die Kernatypien ausgeprägter und der solide Anteil beträgt zwischen 5 % und 50 %. Differenzierungsgrad Grad 3 beinhaltet erhebliche Kernpleomorphien, nukleäre Hyperchromasie, Riesenzellen und solide Anteile, die mehr als 50 % ausmachen (Silverberg 2000, Kreienberg 2009).

2.4 Zielsetzung und Fragestellung

Die Historie der Graduierungssysteme zeigt auf, wie schwierig die Entwicklung eines allgemein akzeptierten Systems ist und erklärt auch ein Stück, warum man sich auch heute noch nicht auf ein einheitliches Modell einigen konnte. Es gibt keine klaren Richtlinien, viele Institute benutzen eigene Graduierungssysteme oder haben sich für eines der vorher erwähnten Systeme entschieden. Selbst spezialisierte Gynäkopathologen geben oft an, dass die Entscheidung durch ihr Bauchgefühl mit beeinflusst wird. Silva und Gershenson sehen 1998 das Ziel, ein einheitliches Graduierungssystem zu finden, sogar als unerreichbar an (Silva and Gershenson 1998).

Da aber trotz unterschiedlicher Systeme die Graduierung mit zu den wichtigsten prognostischen Markern beim Ovarialkarzinom gehört und man der Patientin eine zuverlässige und dem Tumor entsprechende Therapie anbieten möchte, besteht weiterhin ein sehr großes Interesse in einer internationalen Standardisierung der Graduierung.

Mit dieser Arbeit sollen vor allem folgende Fragen geklärt werden.

Zum Einen Fragen zu dem Graduierungssystem selbst:

- Lässt sich das vom MDACC entworfene Zweistufen-Graduierungssystem für seröse Ovarialkarzinome auch zur Graduierung von klarzelligen, endometrioiden und muzinösen Ovarialkarzinomen nützen?
- Ist dieses System leicht erlernbar? Sind die prognostischen Daten signifikant? Wie ist die Korrelation zu klinischen Daten? Wie ist die Reproduzierbarkeit?
- Wie korreliert das Graduierungssystem mit dem weit verbreitetem System von Shimizu und Silverberg?
- Was passiert mit der Gruppe der ehemaligen Grad 2 Karzinome?

Zum Anderen Fragen zur molekularen Relevanz des Graduierungssystems:

- Weisen die nach Malpica als low-grade graduierten Karzinome die zu erwartende Anzahl an braf oder kras Mutationen auf?
- Haben diese Karzinome wie zu erwarten keine p53 Mutation?
- Lässt sich mit den Ergebnissen der molekularen Untersuchung der duale Tumorgeneseweg bestätigen?

3. Methoden und Material

3.1 Graduierung nach Malpica (MDACC)

3.1.1 Patientenkollektiv

Für diese Studie werden 241 primäre Ovarialkarzinome aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgewählt. Dabei handelt es sich in 194 Fällen um seröse Karzinome (Durchschnittsalter 61,5 Jahre, zwischen 10 und 87 Jahren), in 22 Fällen um endometrioidale Karzinome (Durchschnittsalter 61,9 Jahre, zwischen 34 und 87 Jahren), in 15 Fällen um muzinöse Karzinome (Durchschnittsalter 64,3 Jahre), in neun Fällen um klarzellige Karzinome (Durchschnittsalter 54,0 Jahre, zwischen 35 und 76 Jahre) und in einem Fall um ein gemischt endometrioid-klarzelliges Karzinom (41 Jahre). Borderlinetumore werden ausgeschlossen. Das Durchschnittsalter aller an der Studie teilnehmenden Frauen beträgt bei Erstdiagnose 61,3 Jahre.

Alle Patientinnen wurden zwischen 1981 und 2003 im Klinikum Großhadern chirurgisch behandelt, zusätzlich erhielten einige abhängig von ihrem Stadium eine Chemotherapie oder wurden bestrahlt.

Pro Fall existieren zwischen drei und 25 hämatoxylin-eosin (HE) gefärbte Schnitte; zur Auswertung dient jeweils das Areal mit den auffälligsten histomorphologischen Veränderungen.

Die Präparate wurden bereits von Pathologen der Pathologie LMU München in einer länger zurückliegenden Studie („Grading of Ovarian Carcinomas“-Mayr, Diebold 2000) beurteilt und es liegen Daten bezüglich der Graduierung nach Silverberg und Shimizu (Grad 1: 25 Fälle; Grad 2: 107 Fälle; Grad 3: 109 Fälle) und FIGO Stadium (FIGO 1: 41 Fälle; FIGO 2: 21 Fälle; FIGO 3: 152 Fälle; FIGO 4: 12 Fälle) vor.

Epidemiologische Daten (Diagnosedatum, Sterbedatum, Überleben etc.) stammen vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Universität München. Der Beobachtungszeitraum reicht von 0 Monate (Tod noch im gleichen Monat) bis 279 Monate (23,3 Jahre) nach Diagnosestellung. Endereignisse sind entweder der Tod der Patientin oder der Tag des letzten Kontakts mit dem Krankenhaus bzw. dem behandelnden Arzt.

3.1.2 Graduierung

Unabhängig vom histologischen Subtyp (serös, muzinös, endometrioid, klarzellig) werden alle Fälle mindestens zwei Mal mit Hilfe eines binokularen Mikroskops untersucht und nach dem vorgestellten Graduierungssystem von Malpica beurteilt. Hier nochmals kurz die tabellarische Darstellung, vgl. Tabelle 3.

Tabelle 3: Zweistufen-Graduierungssystem von Anais Malpica

	<i>Low-grade Karzinome</i>	<i>High-grade Karzinome</i>
Zellkerne	einheitlich	Variationen, bizarr
Anzahl Mitosen pro 10 HPF	< 13	≥ 13

Zur bessern Illustration des angewandten Systems dienen die Abbildungen 6 – 9, detailliert noch einmal in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Zuordnung der histologischen Beispiele den Abbildungen 6 - 9

<i>Histologie</i>	<i>Graduierung</i>	<i>Abbildung</i>
Seröses Ovarialkarzinom	Low-grade	6a
	High-grade	6b
Muzinöses Ovarialkarzinom	Low-grade	7a
	High-grade	7b
Endometrioides Ovarialkarzinom	Low-grade	8a
	High-grade	8b
Klarzelliges Ovarialkarzinom	Low-grade	9a
	High-grade	9b

Abbildung 6a: Seröses low-grade Ovarialkarzinom, 200x und 400x

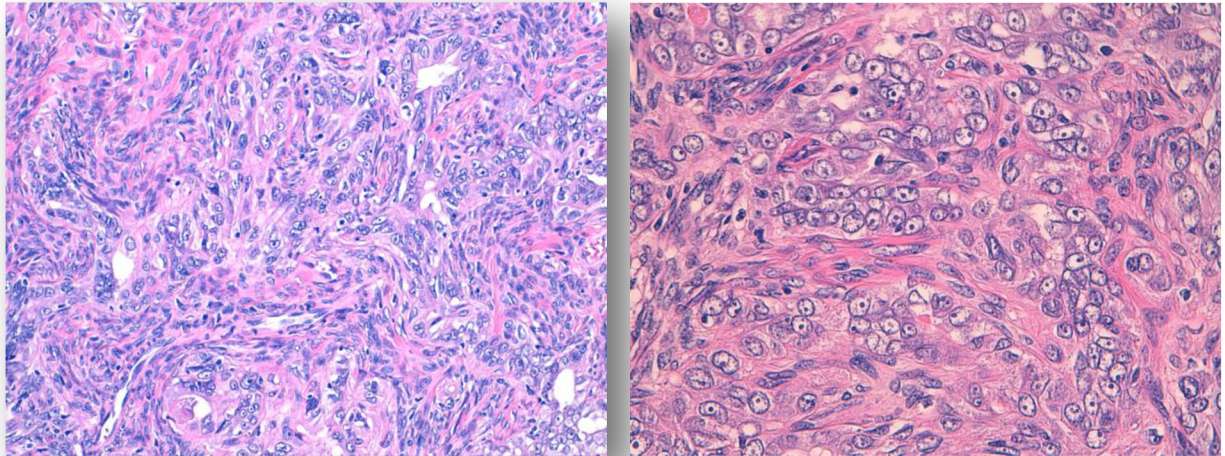


Abbildung 6b: Seröses high-grade Ovarialkarzinom, 200x und 400x

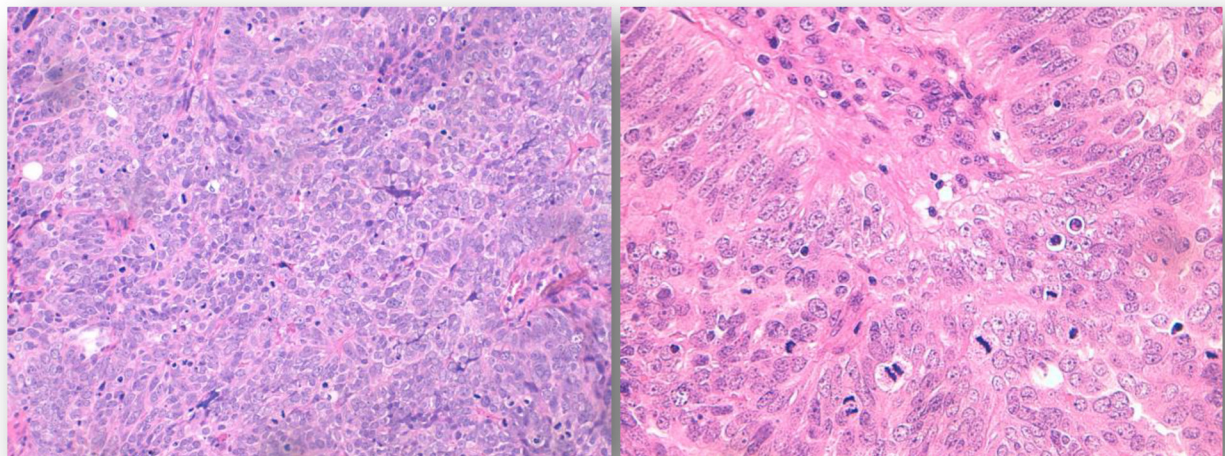


Abbildung 7a: Muzinöses low-grade Ovarialkarzinom, 200x und 400x

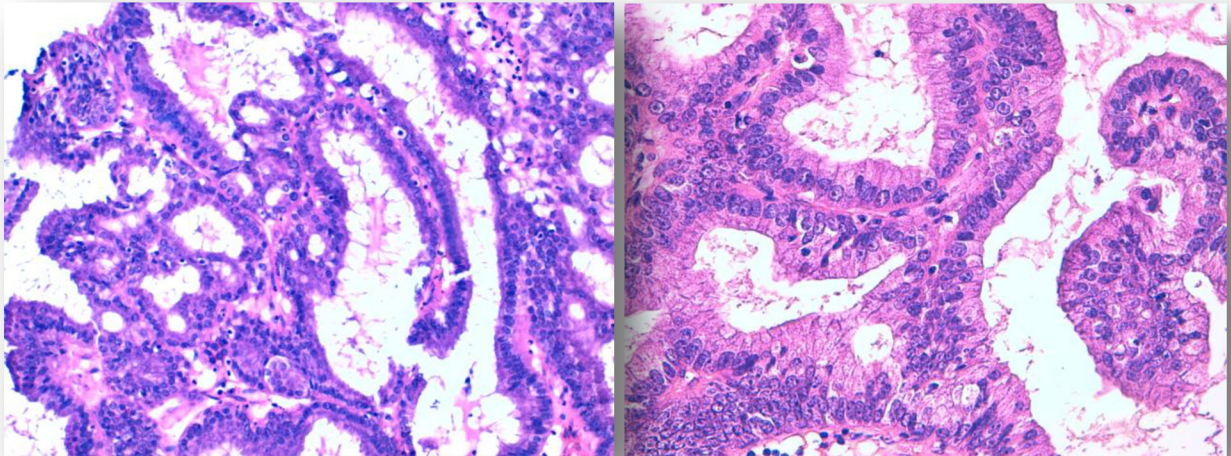


Abbildung 7b: Muzinöses high-grade Ovarialkarzinom, 200x und 400x

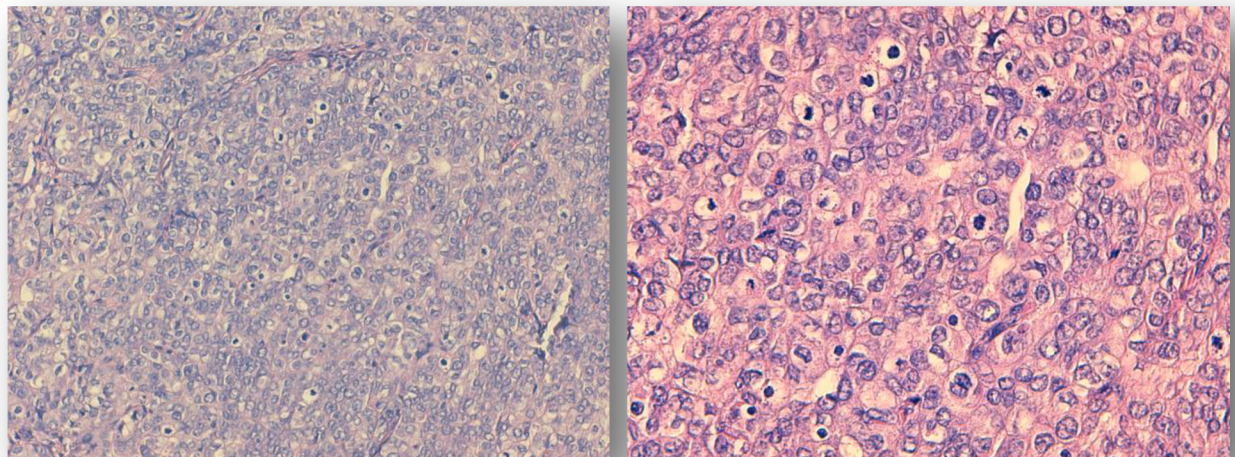


Abbildung 8a: Endometrioides low-grade Ovarialkarzinom, 200x und 400x

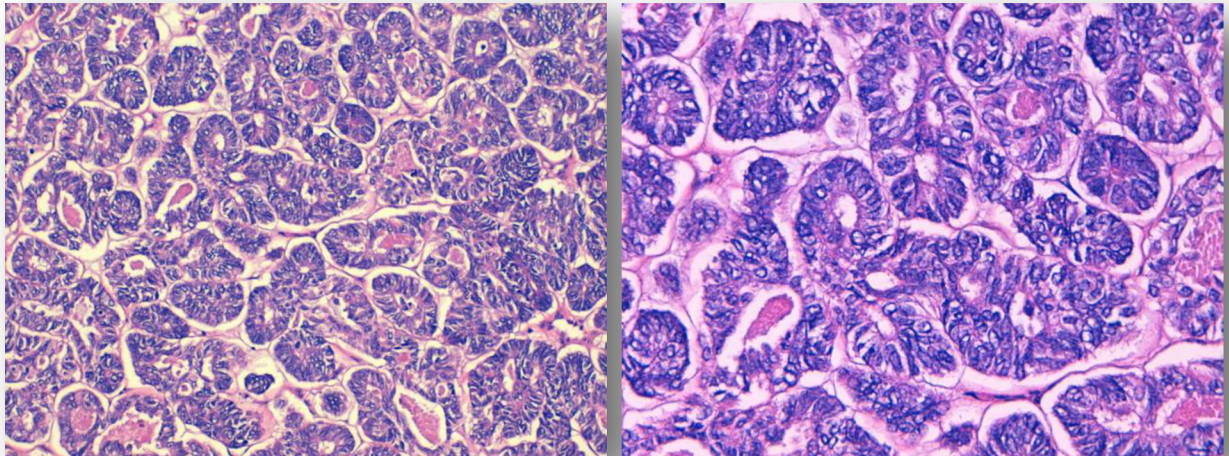


Abbildung 8b: Endometrioides high-grade Ovarialkarzinom, 200x und 400x

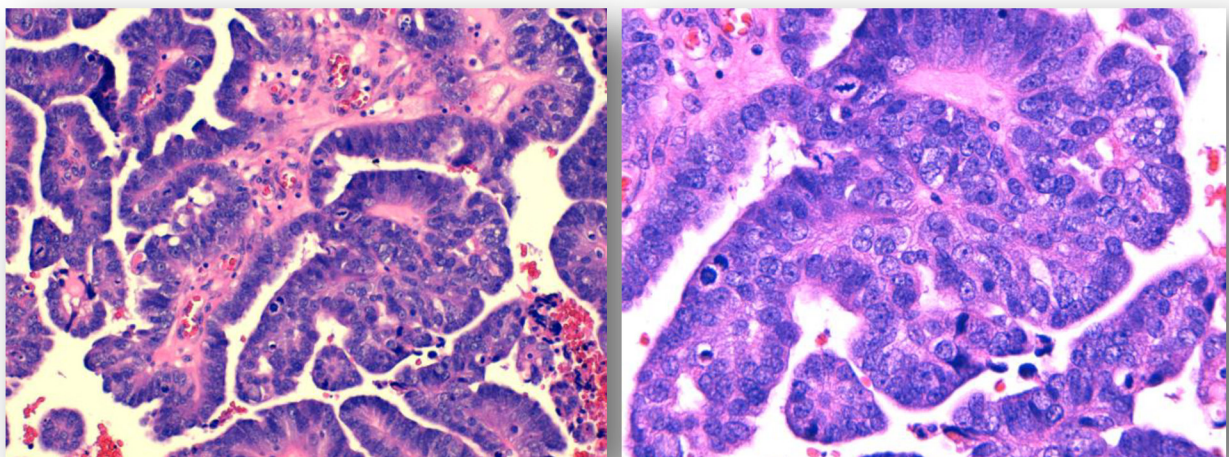


Abbildung 9a: Klarzelliges low-grade Ovarialkarzinom, 200x und 400x

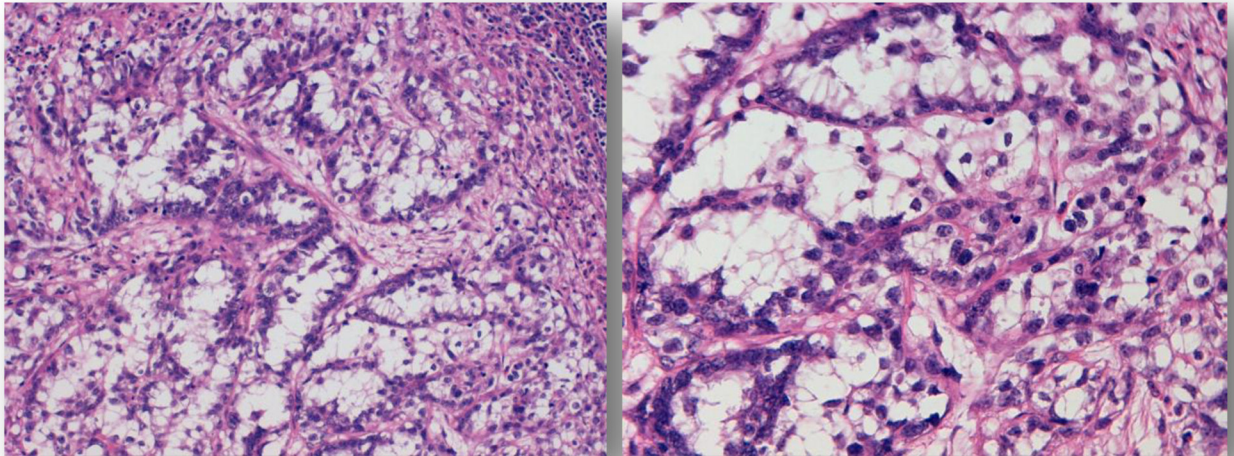
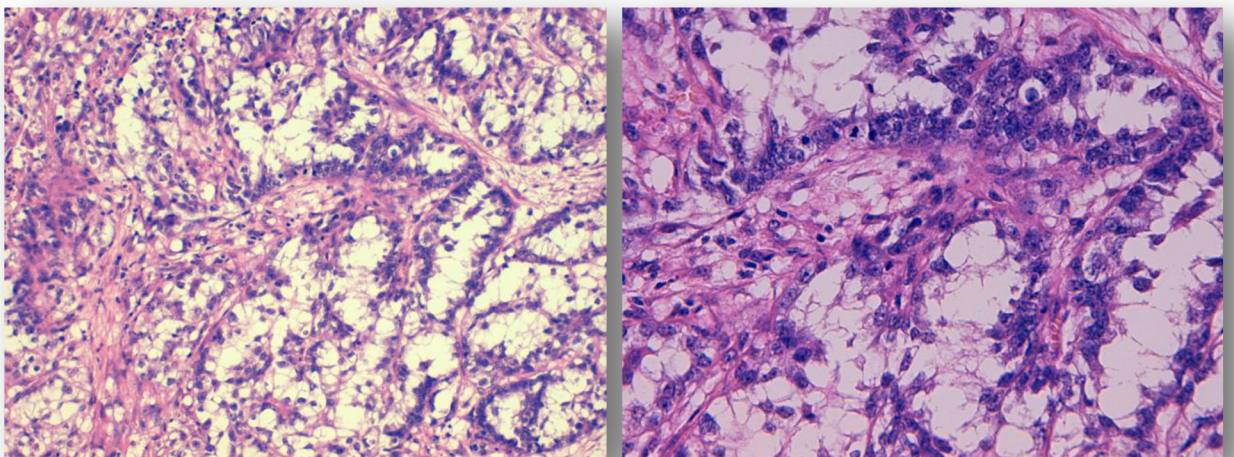


Abbildung 9b: Klarzelliges high-grade Ovarialkarzinom, 200x und 400x



3.2 Kras und braf Mutationsanalysen

3.2.1 Patientenkollektiv

Von den nach Malpica neu graduierten Karzinomen werden die als low-grade eingestuften Tumoren nun bezüglich Mutationsanalysen von braf (codon 600, exon 15) und kras (codon 12 und codon 13, exon 2) untersucht. Unter diesen 48 low-grade Karzinomen befinden sich 33 seröse, sieben endometrioide, sechs muzinöse und zwei klarzellige Karzinome.

3.2.2 Isolation der genomischen DNA

Pro Fall werden von jedem der vorhandenen Paraffinblöcke mit dem Mikrotom sieben Leerschnitte und ein dazu passender Hämatoxylin-Eosin gefärbter Schnitt angefertigt (ca. 2 – 3 µm Dicke). Als Deckgläser dienen SuperFrost Ultra Plus Objektträger; auf dem Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitt wird das zu beurteilende Tumorareal (mindestens 50 % des markierten Anteils) markiert und anschließend auf die entparaffinierten Leerschnitte übertragen.

3.2.2.1 Entparaffinierung

Die Leerschnitte werden zunächst nacheinander (à zehn Minuten) in drei Xylol Bädern, anschließend (wieder à zehn Minuten) in drei Ethanol Bädern entparaffiniert und zum Trocknen schließlich unter den Abzug gestellt.

3.2.2.2 Lyse der Gewebeprobe, Bindung und Reinigung der DNA

Im trockenen Zustand wird das zuvor auf dem Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitt markierte Tumorareal auf sechs der sieben Leerschnitte übertragen und mit Hilfe eines Skalpells von den Leerschnitten abgekratzt und in einem Eppendorfgefäß mit 180µl ATL Buffer und 20µl Proteinase K gesammelt. Nach dem Vortexen (mithilfe des Vortexmischers, ein Schüttelgerät) werden alle Präparate fünf Stunden bei 56 Grad in den Thermomixer zur vollständigen Lyse gegeben. Nach zehn-minütiger Erhitzung im Thermomixer zur Inaktivierung des Enzyms und anschließendem Zentrifugieren wird die DNA mithilfe des QIAcube (Kit: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit; Protokollname: Isolation of genomic DNA from FFPE tissue sections) von QIAGEN gereinigt. Der QIAcube ist ein Gerät zur vollautomatischen Aufreinigung von DNA, RNA und Proteinen.

3.2.3 PCR

Die benötigten Materialien stammen fast ausschließlich von QIAGEN (Qiagen GmbH, Qiagen Straße 1, Hilden, Deutschland), lediglich die Nukleotide sind von Fermentas (Fermentas GmbH, Opelstraße 9, St. Leon-Rot, Deutschland). Bei der PCR für kras (91 bp) wird der Primer KRAS A1975/A1976 verwendet, bei der PCR für braf (82 bp) der Primer BRAF A1954/A1955.

Zur Primervorbereitung wird aus dem 100µM Stock die 20µM Gebrauchslösung für den Primer-Mix hergestellt; sie besteht aus 20µl von Primer A, 20µl von Primer B und 60µl H₂O.

Als Positivkontrollen dienen MaleDNA, H₂O und als Zelllinie RKO (kolorektales Karzinom).

Die Zusammensetzung des PCR Ansatzes ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR Ansatzes

<i>H₂O</i>	32,6µl
10x Puffer	4,0µl
dNTP (10mM)	0,8µl
Primer-Mix (20µM)	0,8µl
Taq	0,2µl
DNA	2,0 µl
Gesamt	40,0 µl

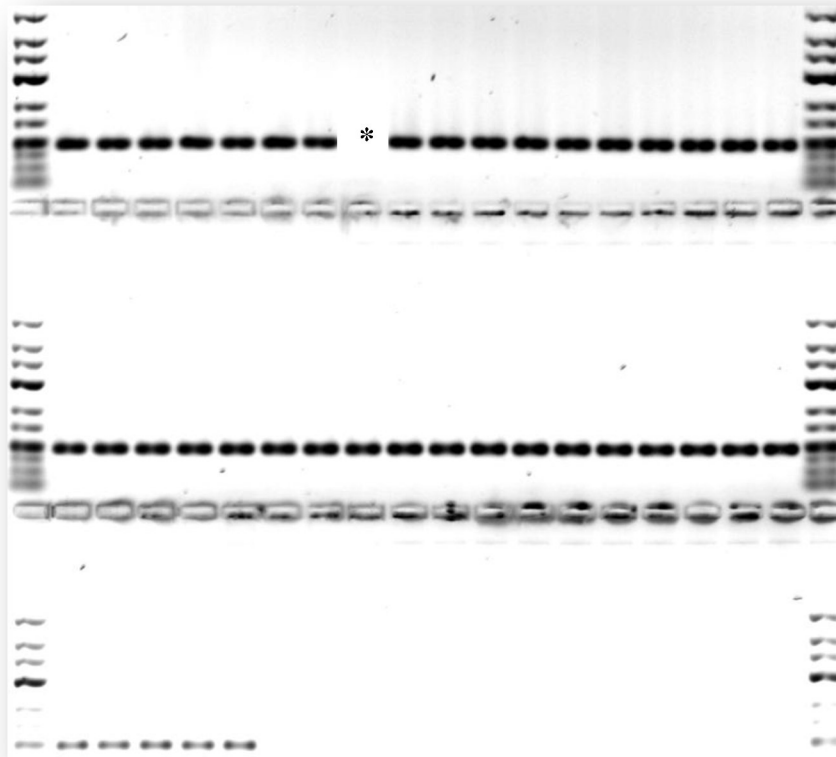
Die PCR wird im Thermo Hybaid MBS der Thermo Fisher Scientific GMBH (Im Heiligen Feld 17, 58239 Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Sowohl für kras als auch braf wird folgendes Cyclex-Programm verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: PCR Cycler-Programm

<i>I</i> x	95°C	1-5 min
50x	95°C	30 sec
	60°C	30 sec
	72°C	30 sec
1x	72°C	2 min
	20°C	1 sec

Um den Erfolg der PCR zu beurteilen, werden im Anschluss jeder PCR die Proben einer Gelelektrophorese zugeführt. Die PCR Produkte werden zusammen mit Positivkontrollen und Wasser auf ein zweiprozentiges Gel aufgetragen („beladen“) und bei einer Spannung von 120V etwa 45 Minuten wandern gelassen. Aufgrund der negativen Ladung der DNA-Moleküle wandern sie vom negativen zum positiven Pol, je nach Länge der Moleküle unterschiedlich weit. In Abbildung 10 kann man erkennen, dass eine Probe nicht gelaufen ist (siehe *-Markierung). Mit Hilfe der Gelelektrophorese können solche Proben identifiziert werden, die PCR wird in diesen Fällen dann wiederholt.

Abbildung 10: Gelelektrophorese einer braf PCR



3.2.4 Pyrosequenzierung

Die verwendeten Materialien stammen von Qiagen (Biotage). Die Reagenzien werden zunächst auf Raumtemperatur erwärmt, anschließend findet die Immobilisierung der PCR Produkte an Beads statt. Diese müssen durch schütteln resuspendiert werden. Für eine zu sequenzierende Probe dient folgender Ansatz (vgl. Tabelle 7):

Tabelle 7: Ansatz zur Pyrosequenzierung

	1x
Beads (Streptavidin Sepharose High Performance)	2 µl
Binding Buffer	40 µl
Wasser	23 µl
PCR Produkt	15 µl
Summe	80 µl

Anschließend werden sie 10 Minuten auf dem Schüttler inkubiert.

Im zweiten Schritt durchwandern die Proben gemäß Anleitung die Waschstation (Pyro Mark Q24 Vacuum Prep Workstation), welche die PCR Produkte in einzelsträngige Templates umwandelt. Die Proben werden nun auf die PyroMark Q24 Platte, auf der sich pro Napf 25 µl Primer (0,3 µM Sequenzierungsprimer in 25 µl Annealing Buffer) bzw. in einem Napf 25 µl des Control Oligo befinden, gegeben. Um die Anlagerung der Sequenzierungsprimer gewährleisten zu können, werden die Platten für zwei Minuten auf 80 Grad erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur fünf Minuten abgekühlt.

Im dritten und letzten Schritt werden die Platten sequenziert (Pyro Mark Q24). Hierzu werden nach einem festen Protokoll, abhängig von der Anzahl der zu sequenzierenden Proben, sogenannte Cartridges (Patronen, die in den Pyro Mark Q24 eingesetzt werden) mit Enzymmix, Substratmix und den einzelnen Nukleotiden pipettiert. Die Ergebnisse werden von dem Gerät auf einem USB Stick gespeichert, der dann mit Hilfe der entsprechenden Computersoftware ausgewertet werden kann.

3.3 p53 Immunhistochemie

Pro Fall wird einer der sieben zuvor für die Mutationsanalysen angefertigten Leerschnitte verwendet. Ziel ist es, Proteine mithilfe eines bestimmten p53 Antikörpers sichtbar zu machen. Mittels einer immunhistochemischen Färbung, die für jedes Präparat erfolgt, kann somit bestimmt werden ob und mit welcher Häufigkeit das Protein in diesem Gewebe vorliegt.

Die immunhistochemische Untersuchung erfolgt vollautomatisch am Ventana Benchmark XT (Firma Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Der verwendete Antikörper ist der p53 Ab-5 von Fermentas.

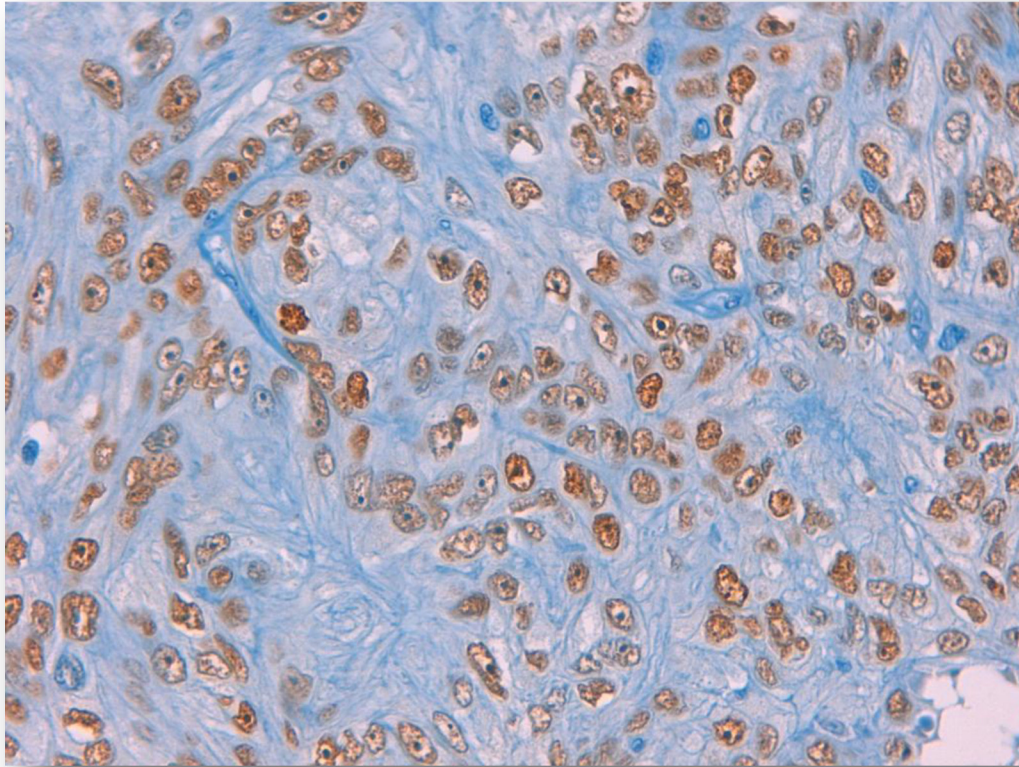
Anschließend werden die Präparate in zwei voneinander unabhängigen Durchgängen unter dem Mikroskop beurteilt.

Die Einteilung erfolgt nach einem dreistufigen System, abhängig vom Anteil der immunhistochemischen Färbung am Gesamtanteil des Tumors. Immunhistochemisch negative Präparate dürfen lediglich 0 - 1 %, schwach positive 2 - 50 % und stark positive > 50 % gefärbte Areale aufweisen. Ein Beispiel eines stark positiv gefärbten Präparats zeigt Abbildung 11.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 20 (SPSS für Windows, IBM, USA). Kaplan-Meier Überlebenskurven und Log-Rank-Tests dienen zur Darstellung und zum Vergleich des Überlebens. Bei der Bechnung der statistischen Signifikanz wird ein p Wert von < 0,05 als signifikant angenommen.

Abbildung 11: p53 Immunhistochemie, stark positiv (400x)



4. Ergebnisse

4.1 Graduierung

Die Graduierung erfolgt strikt nach den Kriterien des MDACC; unter Einbeziehung aller histologischer Subtypen. 48 (20 %) der 241 Fälle wurden als low-grade und 193 (80 %) als high-grade Ovarialkarzinome eingestuft. Die Abbildungen 12a und 12b zeigen zwei Sonderfälle bei der Graduierung nach Malpica. Auf Abbildung 12a erkennt man ein low-grade Karzinom mit 23 Mitosen, auf Abbildung 12b ein high-grade Karzinom mit sieben Mitosen.

Abbildung 12a: Low-grade Karzinom, aber 23 Mitosen, 200x und 400x

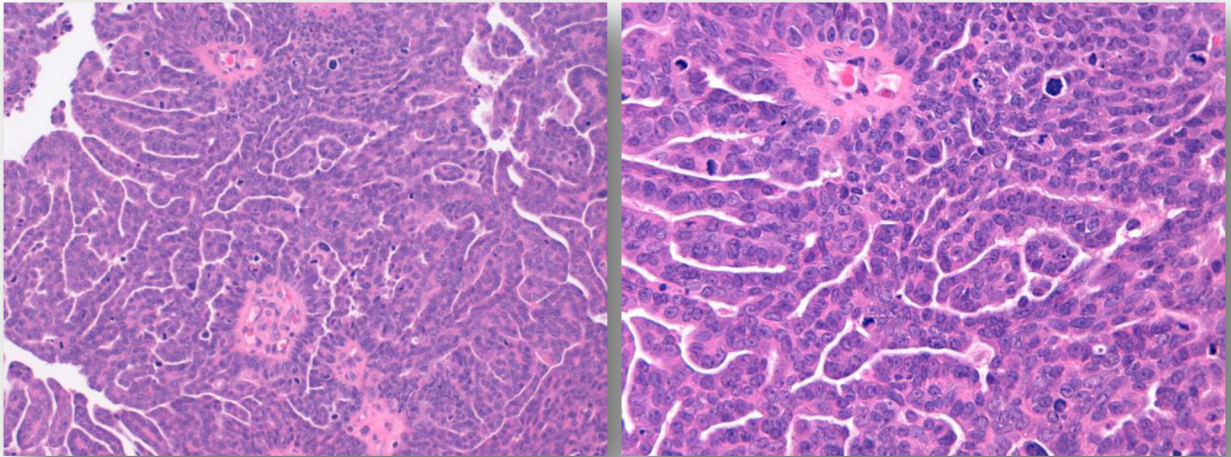
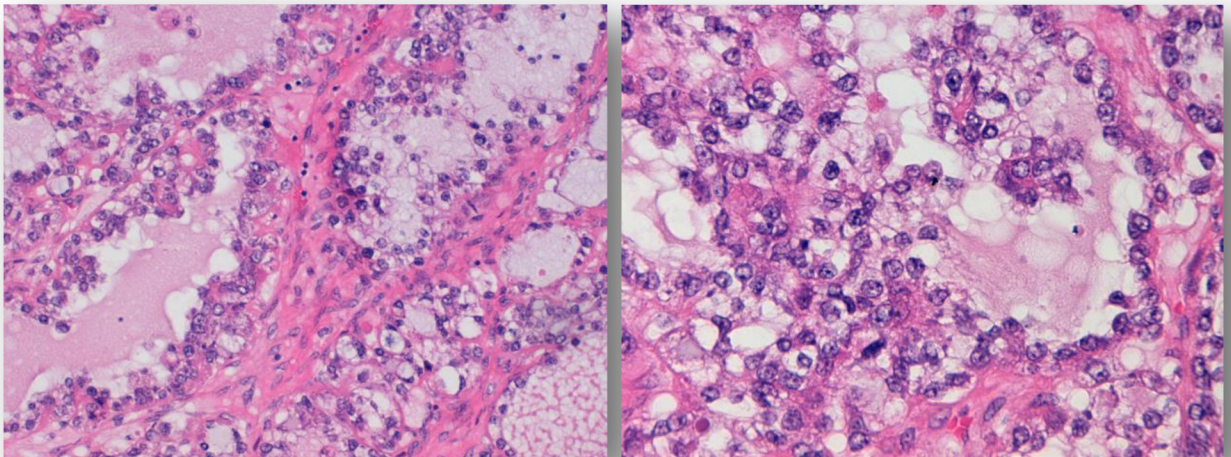


Abbildung 12b: High-grade Karzinom, aber nur 7 Mitosen, 200x und 400x



4.1.1 Korrelation mit Shimizu und Silverberg (SSG)

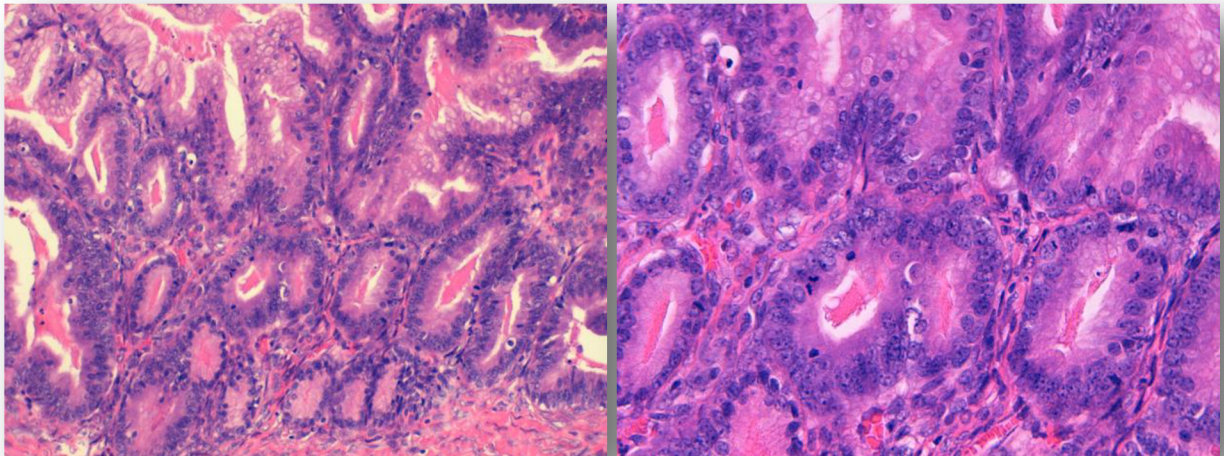
Tabelle 8 stellt die Graduierungsergebnisse von Shimizu/Silverberg (SSG) und dem MDACC gegenüber. Es zeigt sich, dass alle Grad 3 Karzinome nach Shimizu/Silverberg als high-grade Karzinome nach dem System des MDACC graduiert wurden.

Bei zwei Patientinnen (<1 %) trat ein unterschiedliches Graduierungsergebnis gegenüber dem System von Shimizu/Silverberg ein. Auf Abbildung 13 erkennt man ein ehemaliges G1 Präparat, das nach Malpica ein high-grade Karzinom ist.

Tabelle 8: Korrelation der Graduierung nach Shimizu/Silverberg und nach MDACC

	<i>Low-grade</i>	<i>High-grade</i>	<i>Gesamt</i>
Grad 1	20	2	22
Grad 2	28	81	109
Grad 3	0	110	110
Gesamt	48	193	241

Abbildung 13: G1 Präparat nach Shimizu/Silverberg, high-grade nach MDACC, 200x und 400x



Betrachtet man die Gruppe der ehemaligen Grad 2 Karzinome, so teilen sie sich nach dem neuen Zweistufen-System in 28 (26 %) low-grade und 81 (74 %) high-grade Karzinome auf. Von den 84 serösen G2 Karzinomen sind 21 (25 %) low-grade, von den 16 endometrioiden G2 12 (75 %) low-grade, von den 4 muzinösen G2 3 (75 %) und von den 4 klarzelligen G2 2 (50 %) low-grade.

Das Durchschnittsalter der 28 low-grade Patientinnen beträgt 54,3 Jahre bei Diagnose, sie überleben die Krankheit 97,4 Monate. Die 81 high-grade Patientinnen hingegen sind bei Diagnose im Schnitt acht Jahre älter (62,3 Jahre) und sterben fast 59 Monate früher (überleben 38,7 Monate), siehe Abbildung 14.

Die Abbildungen 15a und 15b zeigen histologische Beispiele von zwei ehemaligen G2 Karzinomen, die nach dem MDACC neu graduiert wurden.

Im Anhang befindet sich zudem eine vollständige Aufschlüsselung aller low-grade Karzinome nach Malpica.

Abbildung 14: Kaplan-Meier Kurve der ehemaligen G2 Karzinome

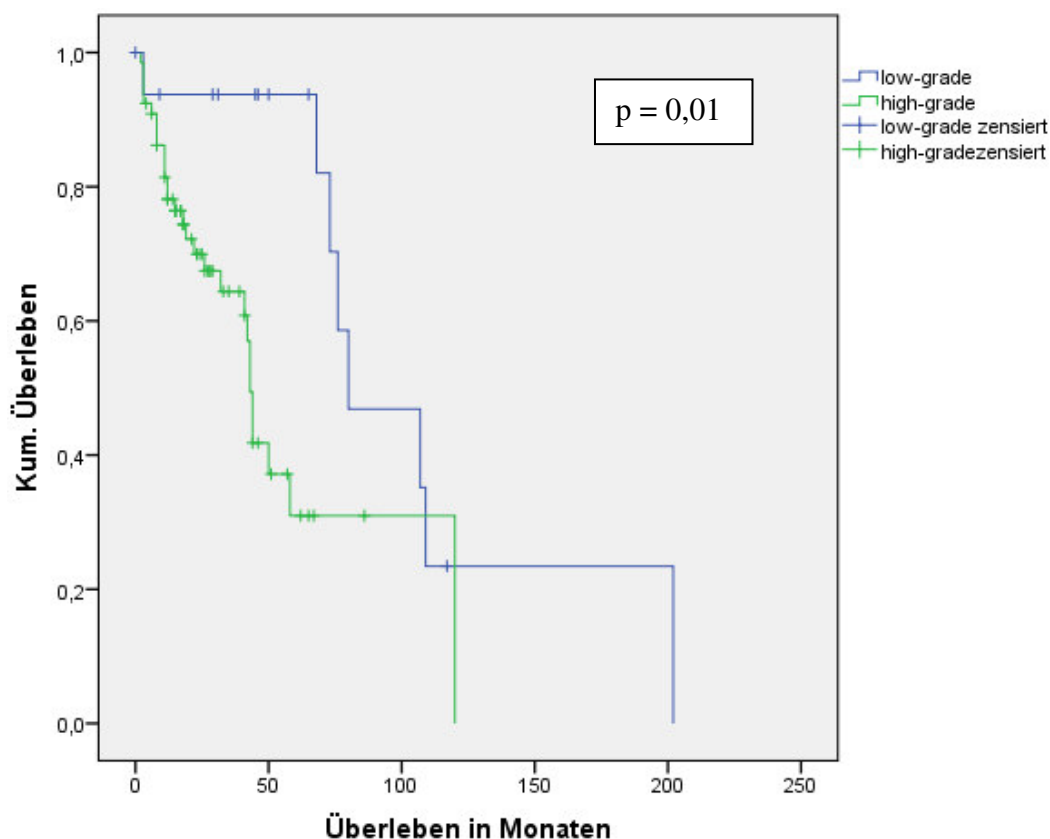


Abbildung 15a: Ehemals als G2 klassifiziertes Karzinom, welches nach dem MDACC als low-grade Karzinom eingestuft wird, 200x und 400x

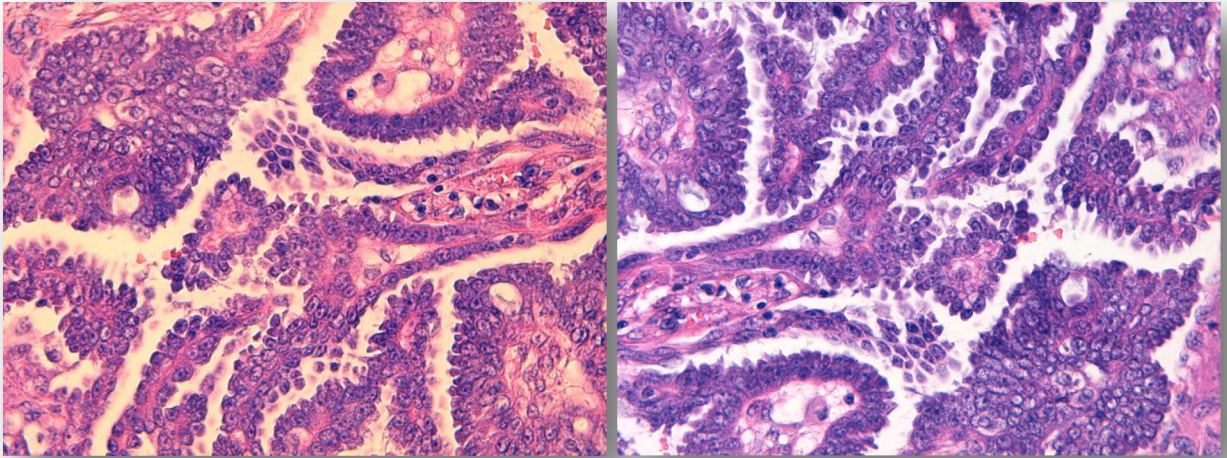
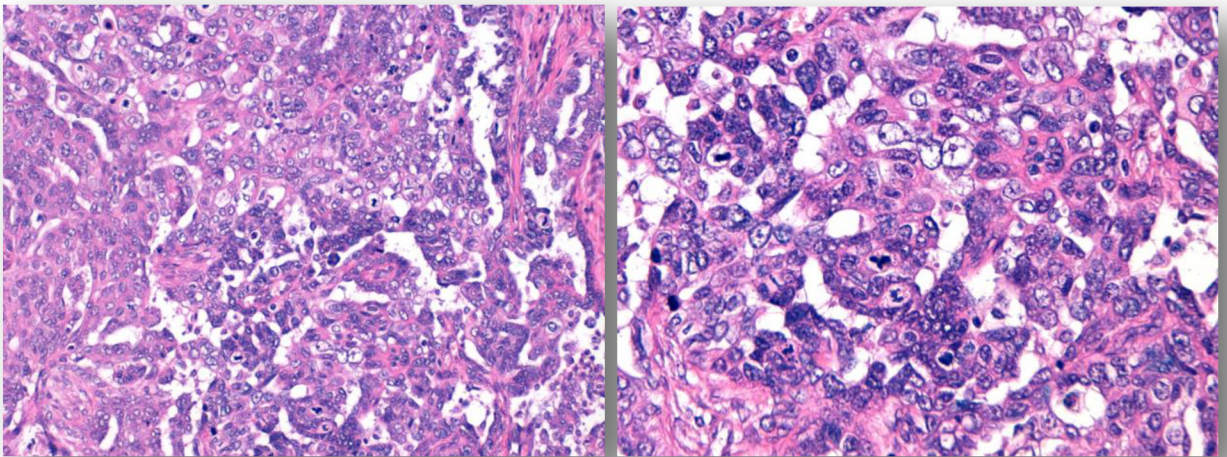


Abbildung 15b: Ehemals als G2 klassifiziertes Karzinom, welches nach dem MDACC als high-grade Karzinom eingestuft wird, 200x und 400x



4.1.2 Korrelation mit FIGO

Während 65 % der low-grade Karzinome in frühen FIGO Stadien diagnostiziert und operiert werden (FIGO 1 und 2), befinden sich bereits 81 % der high-grade Karzinome in einem FIGO Stadium 3 oder höher (vgl. Tabelle 9).

Tabelle 9: Kreuztabelle der FIGO Stadien und der Graduierung nach dem MDACC

	<i>Low-grade</i>	<i>High-grade</i>	<i>Gesamt</i>
Stadium 1	23	18	41
Stadium 2	8	18	26
Stadium 3	17	145	162
Stadium 4	0	12	12
Gesamt	48	193	241

4.1.3 Korrelation mit dem Überleben

Für 80 % der Patientinnen liegt ein komplettes Follow-up vor.

Patientinnen mit einem G1 Karzinom nach SSG (58,3 Jahre, $\sigma = 15,8$ Jahre) leben im Schnitt noch 88 Monate ($\sigma = 80,1$ Monate) nach Diagnosestellung, Patientinnen mit SSG 2 (60,2 Jahre, $\sigma = 13,2$ Jahre) noch 53,7 Monate ($\sigma = 64,1$ Monate) und Patientinnen mit SSG 3 (63,1 Jahre, $\sigma = 12,6$ Jahre) 38,9 Monate ($\sigma = 47,6$ Monate).

Im Vergleich dazu beträgt das Durchschnittsalter bei der Diagnose von low-grade Karzinomen 56,1 Jahre ($\sigma = 15$ Jahre) bei einem mittleren Überleben von 95,5 Monaten ($\sigma = 77,1$ Monate), bei high-grade Karzinomen 62,7 Jahre ($\sigma = 12,4$ Jahre) und 38,8 Monate ($\sigma = 49,4$ Monate).

Die Korrelation zwischen Tumorgraduierung und Überleben beträgt $p = 0,001$ für das zweistufige (nach Malpica) und $p = 0,01$ für das dreistufige System (nach SSG), graphisch in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt.

Abbildung 16: Kaplan-Meier Überlebenskurve für das Zweistufen-System

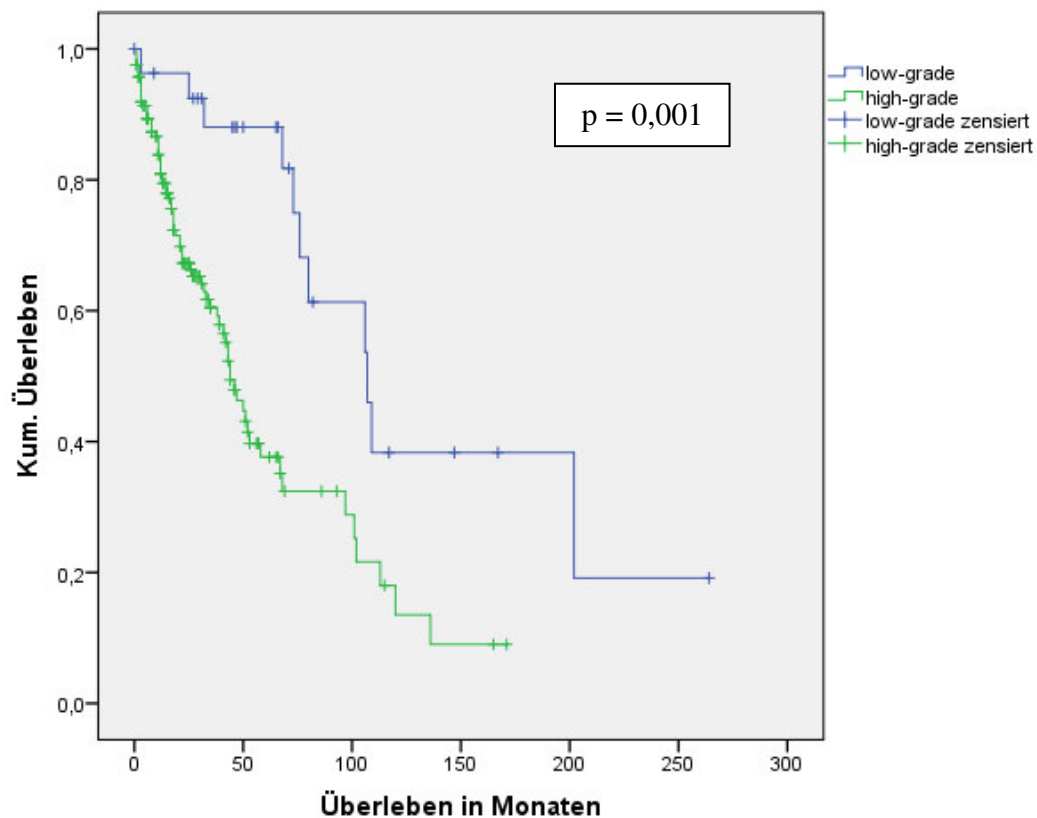
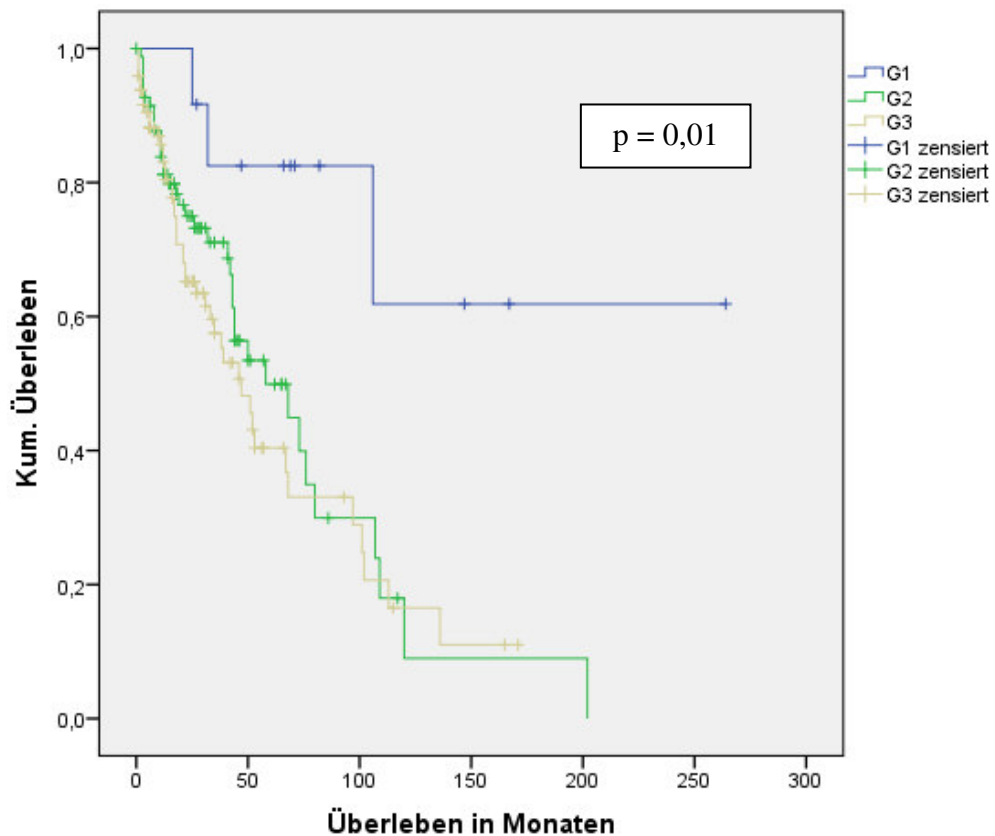


Abbildung 17: Kaplan-Meier Überlebenskurve für das Dreistufen-System



4.1.4 Korrelation mit dem histologischen Subtypen

Da das vom MDACC entwickelte zweistufige System nur für seröse Ovarialkarzinome gilt, erfolgt nun die spezifische Analyse zu den einzelnen histologischen Typen. In den Tabellen 10 und 11 kann man die Aufteilung der histologischen Typen bezüglich ihres Grades selbst und dem angewandten Graduierungssystem sehen.

Tabelle 10: Aufteilung der histologischen Subtypen beim zweistufigen System (MDACC)

	<i>Low-grade</i>	<i>High-grade</i>	<i>Gesamt</i>
Serös	33	161	194
Muzinös	6	9	15
Endometrioid	7	15	22
Klarzellig	2	7	9
Klarzellig/Endometrioid	0	1	1
Gesamt	48	193	241

Tabelle 11: Aufteilung der histologischen Subtypen beim dreistufigen System (SSG)

	<i>Grad 1</i>	<i>Grad 2</i>	<i>Grad 3</i>	<i>Gesamt</i>
Serös	12	84	98	194
Muzinös	7	4	4	15
Endometrioid	3	16	3	22
Klarzellig	0	4	5	9
Klarzellig/Endometrioid	0	1	0	1
Gesamt	22	109	110	241

4.1.4.1 Korrelation der serösen Karzinome

Im Durchschnitt sind Patientinnen mit serösen low-grade Ovarialkarzinomen 52,6 Jahre ($\sigma = 14,9$ Jahre) alt und überleben 99,9 Monate ($\sigma = 88,1$ Monate); bei serösen high-grade Karzinomen sind die Patientinnen 63,3 Jahre alt ($\sigma = 11,8$ Jahre) und überleben nur 37,3 Monate ($\sigma = 47,1$ Monate).

Verglichen dazu beträgt das Alter bei Patientinnen nach dem dreistufigen System von SSG für G1 Patientinnen im Schnitt 51,1 Jahre ($\sigma = 15,3$ Jahre), für G2 Patientinnen 61,5 Jahre ($\sigma = 12,3$ Jahre) und G3 Patientinnen 62,8 Jahre ($\sigma = 12,7$ Jahre) und sie leben im Schnitt noch bei G1 85,0 Monate ($\sigma = 80,7$ Monate), bei G2 52,3 Monate ($\sigma = 65,3$ Monate) und bei G3 38,7 Monate ($\sigma = 45,7$ Monate) nach Diagnosestellung.

Die Korrelation zwischen dem Tumorgrad und dem Überleben der Patientinnen ergibt einen p-Wert von 0,006 für das zweistufige System (vgl. Abbildung 18) und einen p-Wert von 0,162 für das dreistufige System (vgl. Abbildung 19).

Abbildung 18: Kaplan Meier Überlebenskurve für seröse Ovarialkarzinome (MDACC)

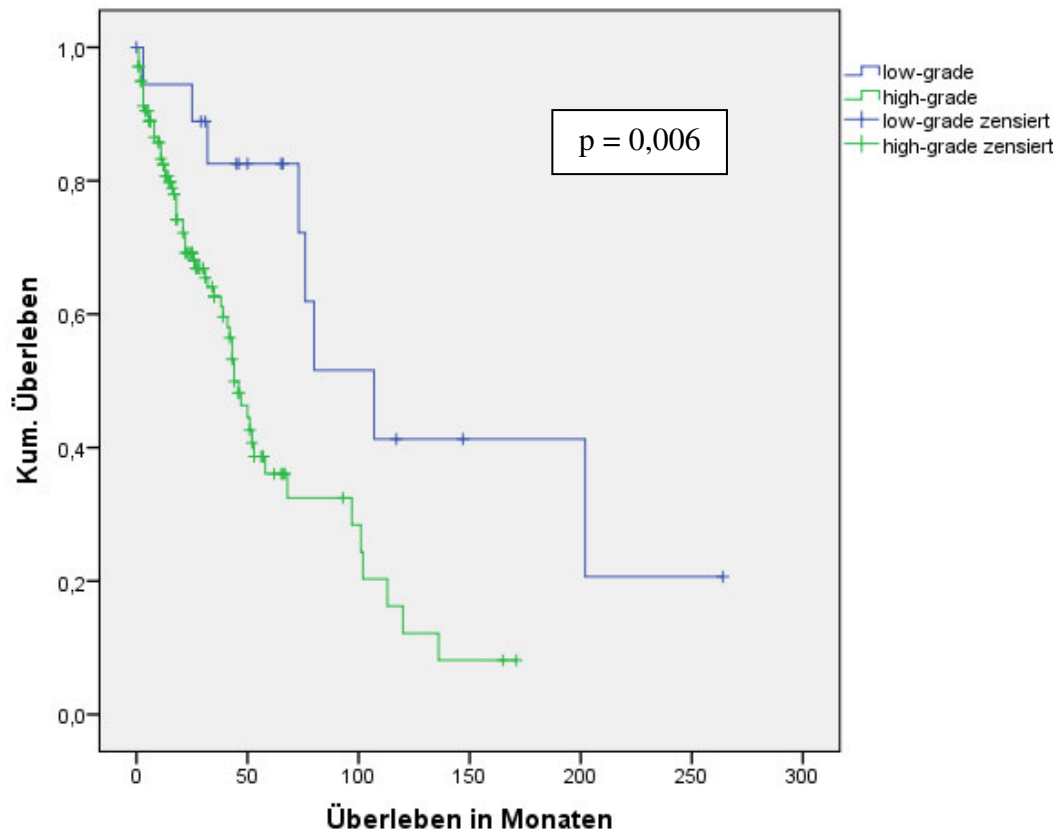
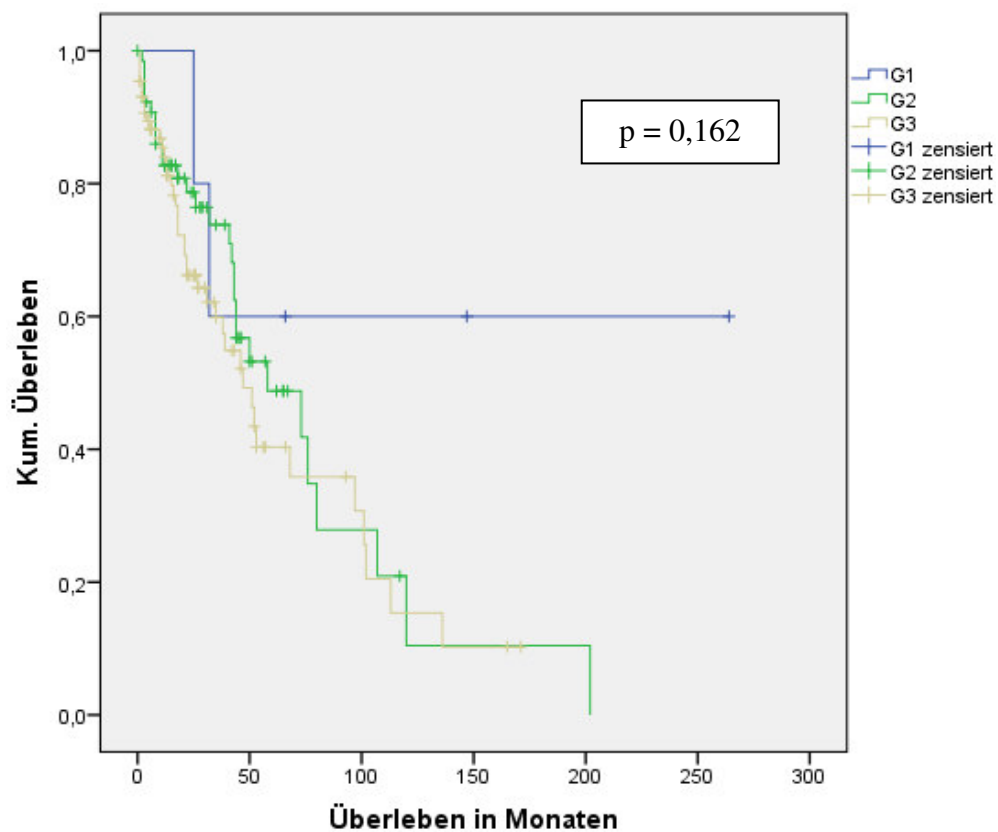


Abbildung 19: Kaplan-Meier Überlebenskurve für seröse Ovarialkarzinome (SSG)



4.1.4.2 Korrelation der muzinösen Karzinome

Bei den muzinösen low-grade Karzinomen sind die Patientinnen 73,5 Jahre ($\sigma=9,8$ Jahre) und überleben 71,2 Monate ($\sigma=58,0$ Monate), bei muzinösen high-grade Karzinomen 58,2 Jahre ($\sigma=13,5$ Jahre) und 49,0 Monate ($\sigma=73,2$ Monate).

Muzinöse G1 Patientinnen sind bei Diagnose durchschnittlich 67,7 Jahre ($\sigma=12,6$ Jahre), G2 56,8 Jahre ($\sigma=19,6$ Jahre) und G3 66,0 Jahre ($\sigma=11,0$ Jahre) alt. Wohingegen G1 Patientinnen noch 108 Monate ($\sigma=93,3$ Monate) überleben, sind es bei G2 nur noch 61,8 Monate ($\sigma=59,6$ Monate) und bei G3 lediglich 56,8 Monate ($\sigma=102,3$ Monate).

Die Korrelation zwischen dem Tumorgrad und dem Überleben der Patientinnen ergibt einen p-Wert von 0,023 für das zweistufige System (vgl. Abbildung 20) und einen p-Wert von 0,016 für das dreistufige System (vgl. Abbildung 21).

Abbildung 20: Kaplan-Meier Überlebenskurve für muzinöse Ovarialkarzinome (MDACC)

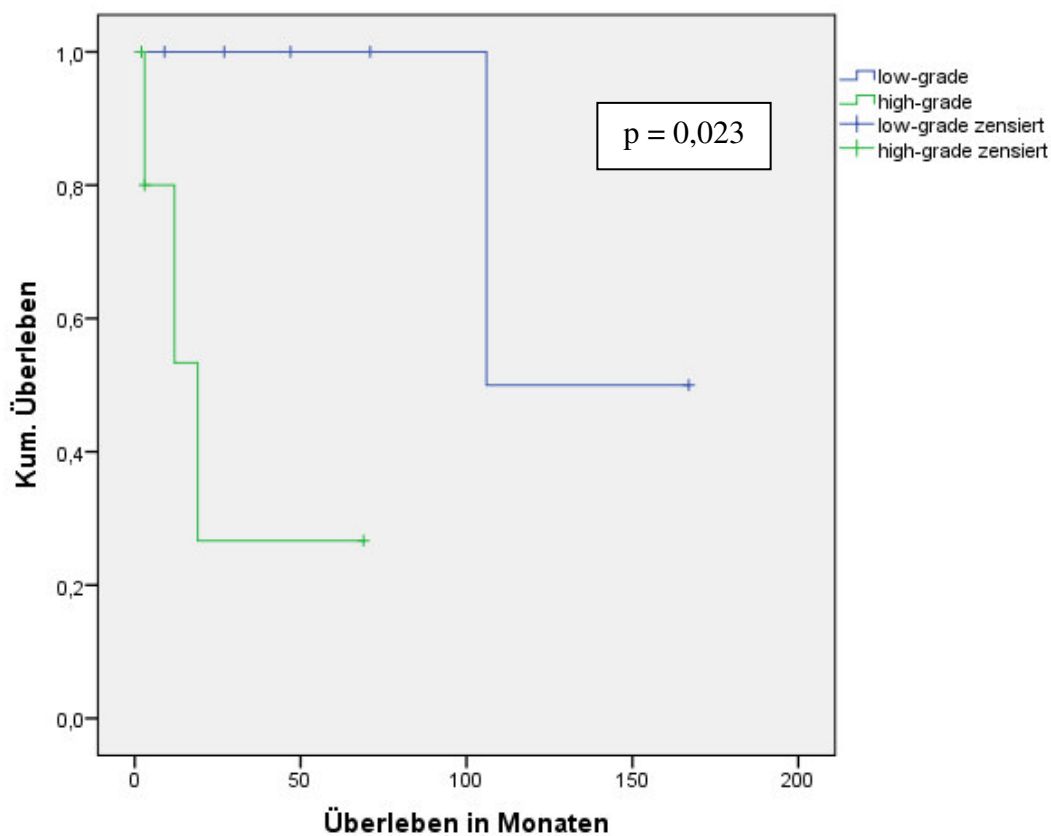
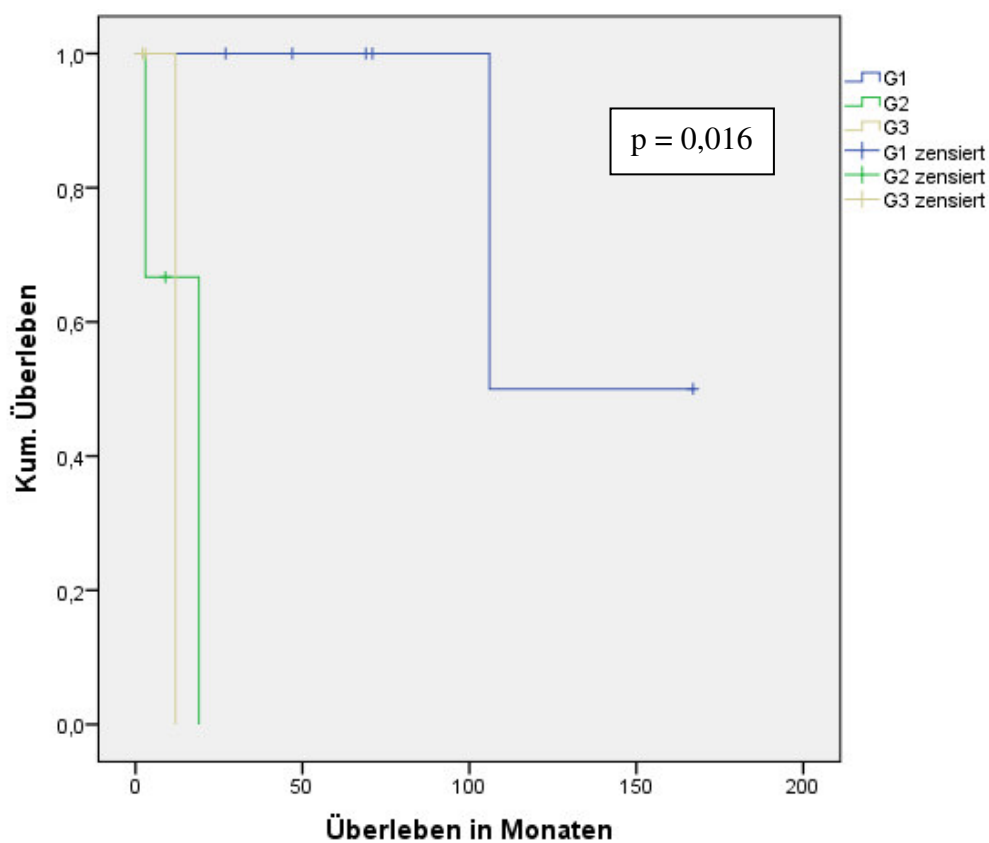


Abbildung 21: Kaplan-Meier Überlebenskurve für muzinöse Ovarialkarzinome (SSG)



4.1.4.3 Korrelation der endometrioiden Karzinome

Patientinnen, denen die Diagnose endometrioides low-grade Ovarialkarzinom gestellt wurde, sind im Durchschnitt 59,9 Jahre ($\sigma = 11,5$) alt und leben im Schnitt noch 101,4 Monate ($\sigma = 36,6$) bevor sie sterben. Endometrioide high-grade Karzinom Patientinnen hingegen bekommen die Diagnose mit 62,8 Jahren ($\sigma = 15,8$) gestellt und überleben 39,4 Monate ($\sigma = 57,0$).

Im Vergleich dazu sind endometrioide G1 Patientinnen bei Diagnose durchschnittlich 65,0 Jahre alt ($\sigma = 13,0$ Jahre), G2 58,9 Jahre alt ($\sigma = 14,9$ Jahre) und G3 74,3 Jahre alt ($\sigma = 4,2$ Jahre). Bei G1 Karzinomen überleben die Patientinnen 53,3 Monate ($\sigma = 45,8$ Monate), bei G2 Karzinomen 56,9 Monate ($\sigma = 66,3$ Monate) und bei G3 Karzinomen 19,3 Monate ($\sigma = 12,7$ Monate).

Die Korrelation zwischen dem Tumorgrad und dem Überleben der Patientinnen ergibt einen p-Wert von 0,307 für das zweistufige System (vgl. Abbildung 22) und einen p-Wert von 0,204 für das dreistufige System (vgl. Abbildung 23).

Abbildung 22: Kaplan-Meier Kurve für endometrioide Ovarialkarzinome (MDACC)

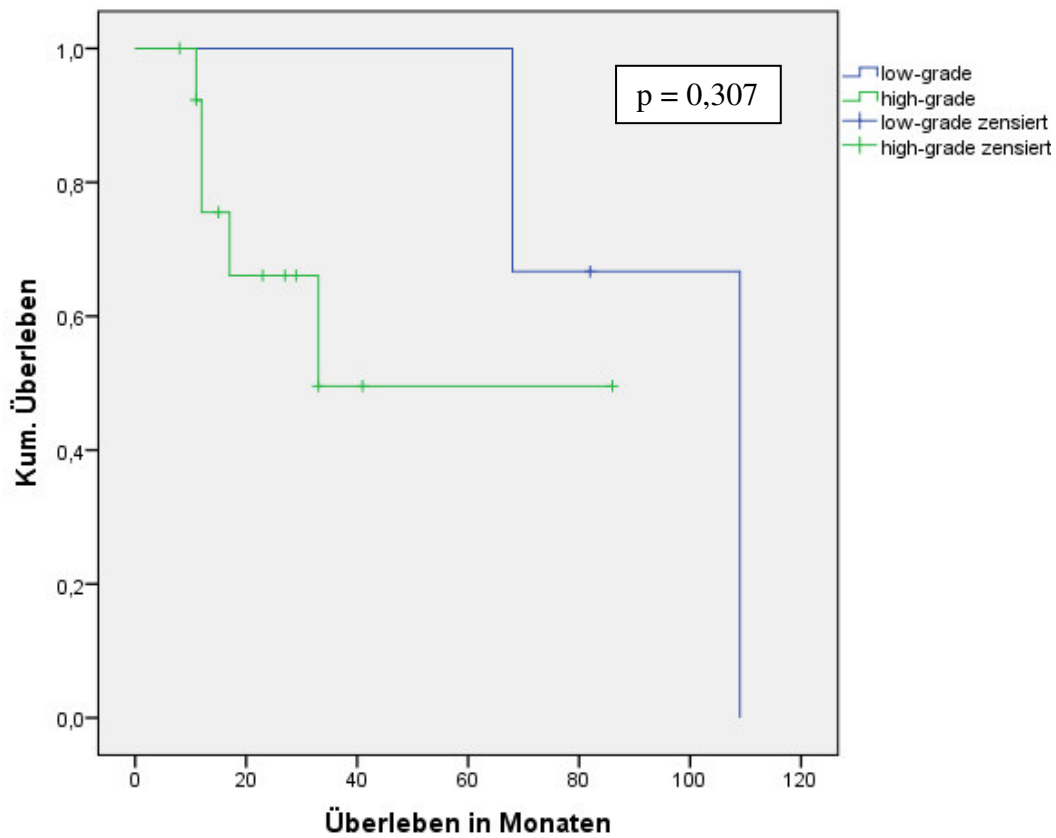
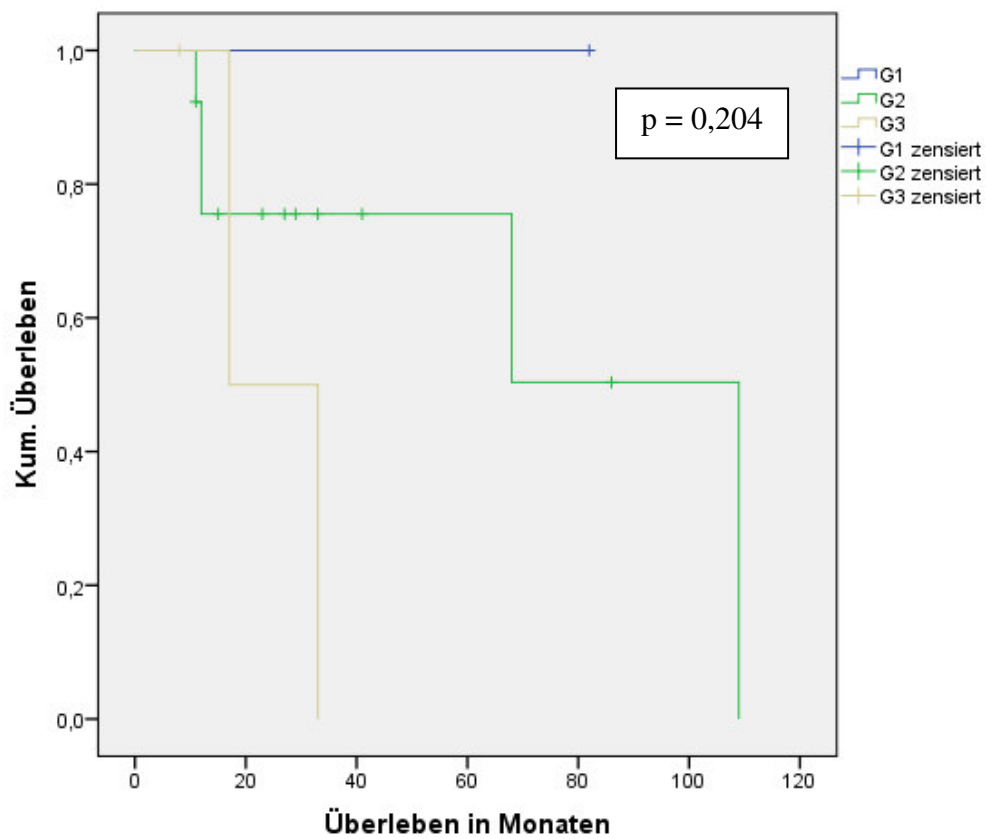


Abbildung 23: Kaplan-Meier Kurve für endometrioide Ovarialkarzinome (SSG)



4.1.4.4 Korrelation der klarzelligen Karzinome

Zwei Patientinnen werden nach dem neuen Graduierungssystem als klarzellige low-grade Ovarialkarzinome eingestuft. Bei Diagnosestellung beträgt ihr Alter im Schnitt 48,0 Jahre ($\sigma = 18,4$ Jahre) und sie leben 208,5 Monate ($\sigma = 150,6$ Monate) nach der Diagnose bis sie tumorabhängig versterben. Patientinnen mit einem klarzellige high-grade Karzinom sind im Durchschnitt 55,7 Jahre ($\sigma = 13,9$ Jahre) alt und überleben 49,1 Monate ($\sigma = 56,0$ Monate).

Nach dem „alten“ Graduierungssystem von Shimizu/Silverberg gibt es keine klarzelligen G1 Ovarialkarzinome. Patientinnen mit klarzelligen G2 Karzinomen sind zum Zeitpunkt der Diagnose 46,8 Jahre ($\sigma = 13,2$ Jahre) alt, G3 Patientinnen 59,8 Jahre ($\sigma = 13,1$ Jahre). Bis zum tumorabhängigen Tod überleben G2 Patientinnen 49,8 Monate ($\sigma = 58,2$ Monate) und G3 Patientinnen 39,2 Monate ($\sigma = 50,3$ Monate).

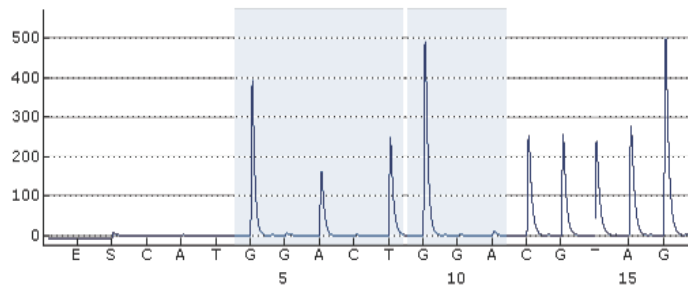
Aufgrund der geringen Fallzahlen erfolgt keine Korrelation zum Überleben.

4.2 Kras und braf Mutationsanalysen

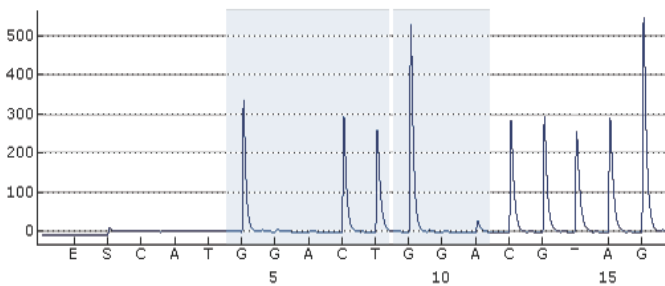
Insgesamt zeigen acht der 48 Patientinnen (17 %) eine kras Mutation, lediglich eine Patientin (2 %) eine braf Mutation. Bei kras tritt die Mutation an drei verschiedenen Orten auf (siehe Abbildung 24).

Abbildung 24: Mutationen bei kras

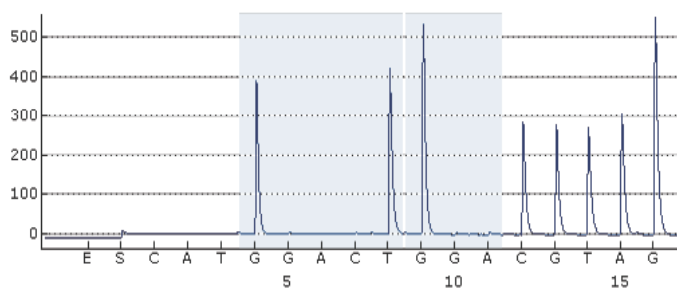
c.35G>A – p.G12D (Aspartat):



c.35G>C – p.G12A (Alanin):



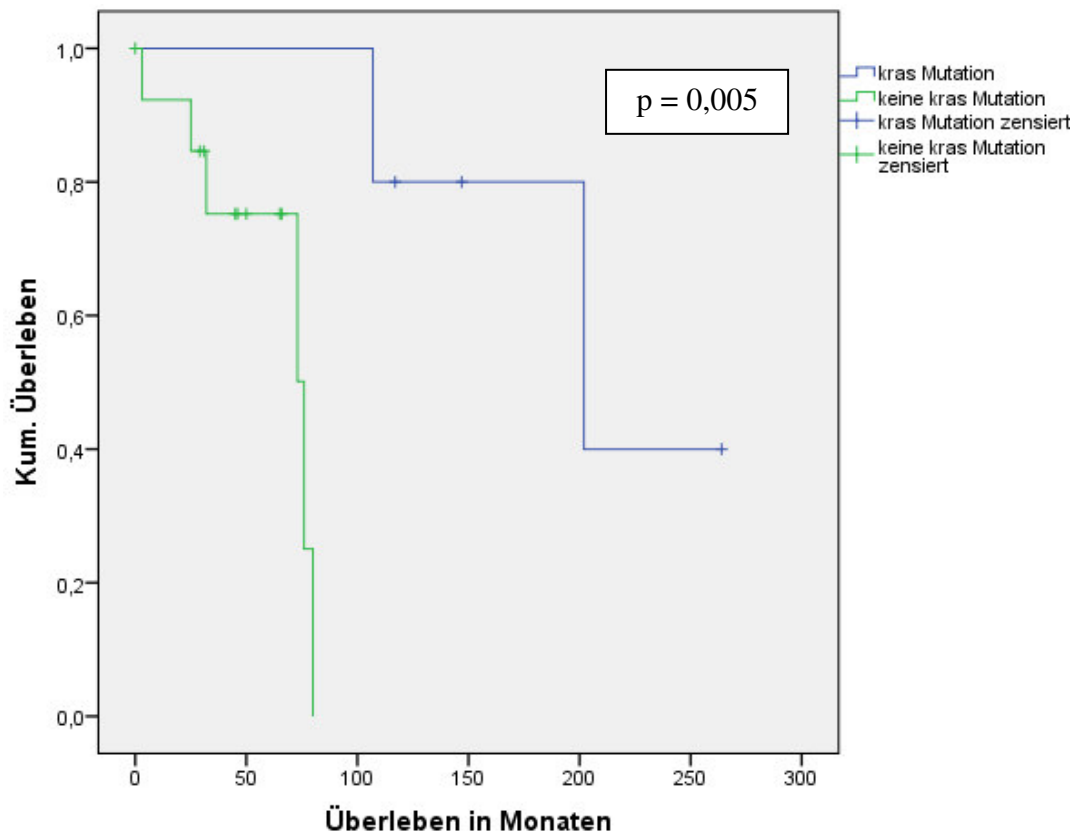
c.35G>T – p.G12V (Valin):



Sechs der 33 serösen Ovarialkarzinome (17 %) weisen eine kras Mutation auf; einmal war davon die Aminosäure Aspartat (c.35G>A - p.G12D), dreimal Alanin (c.35G>C - p.G12A) und zweimal Valin (c.35G>T - p.G12V) betroffen. Patientinnen ohne Mutation sind bei Diagnose im Schnitt 51,6 Jahre alt und überleben 91,1 Monate, mit kras Mutation sind sie 57,0 Jahre alt und überleben 139,5 Monate. In Abbildung 25 ist das Überleben mit

bzw. ohne kras Mutation noch einmal graphisch in einer Kaplan-Meier Kurve dargestellt, der p-Wert beträgt 0,005 und ist somit signifikant.

Abbildung 25: Kaplan-Meier Überlebenskurve für Patientinnen mit kras Mutation bzw. ohne kras Mutation bei serösen low-grade Ovarialkarzinomen



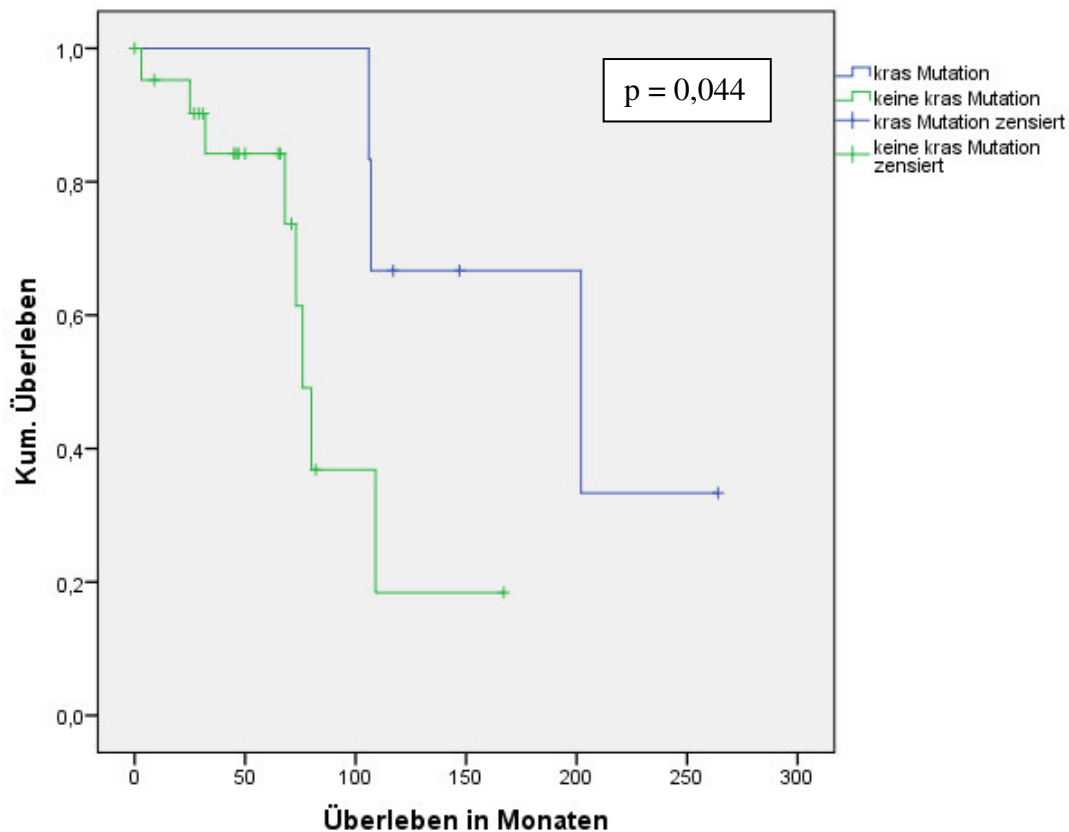
Von den sechs muzinösen low-grade Ovarialkarzinomen weist lediglich eine Patientin (17 %) eine kras Mutation auf - Valin (c.35G>T - p.G12V). Sie ist bei Diagnose 61 Jahre alt (vs. 76 Jahre ohne Mutation) und überlebt den Tumor 106,0 Monate (vs. 64,2 Monate ohne Mutation).

Ebenso zeigt eine der sieben Patientinnen (14 %) mit einem endometrioiden low-grade Karzinom eine kras Mutation, welche die Aminosäure Aspartat (c.35G>A - p.G12D) betrifft. Bei Diagnose war die Patientin 73 Jahre alt (vgl. zu 57,7 Jahre ohne kras Mutation) und verstirbt nach 84,0 Monaten (vgl. zu 104,3 Monaten ohne kras Mutation).

Die zwei klarzelligen low-grade Karzinome zeigen keine kras Mutation.

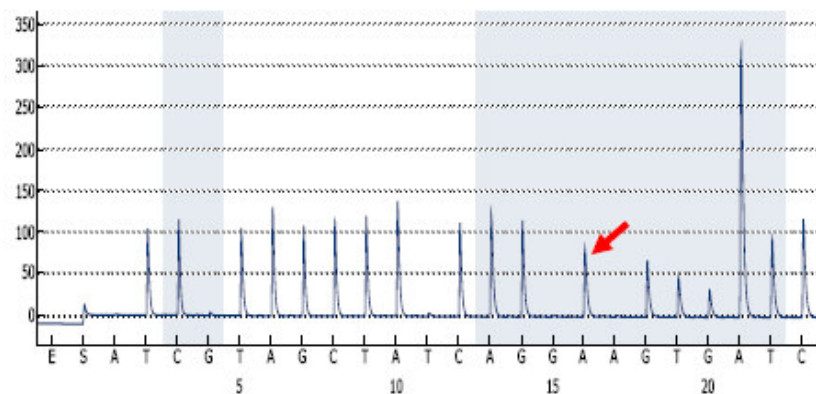
Betrachtet man alle 48 low-grade Ovarialkarzinome, unabhängig von ihrem histologischen Subtyp, so ist bei acht Fällen eine *kras* Mutation festgestellt worden. Abbildung 26 verdeutlicht, dass Patientinnen mit *kras* Mutation signifikant länger überleben als Patientinnen ohne dieser Mutation ($p = 0,044$).

Abbildung 26: Kaplan-Meier Überlebenskurve für Patientinnen mit *kras* Mutation bzw. ohne *kras* Mutation bei low-grade Ovarialkarzinomen



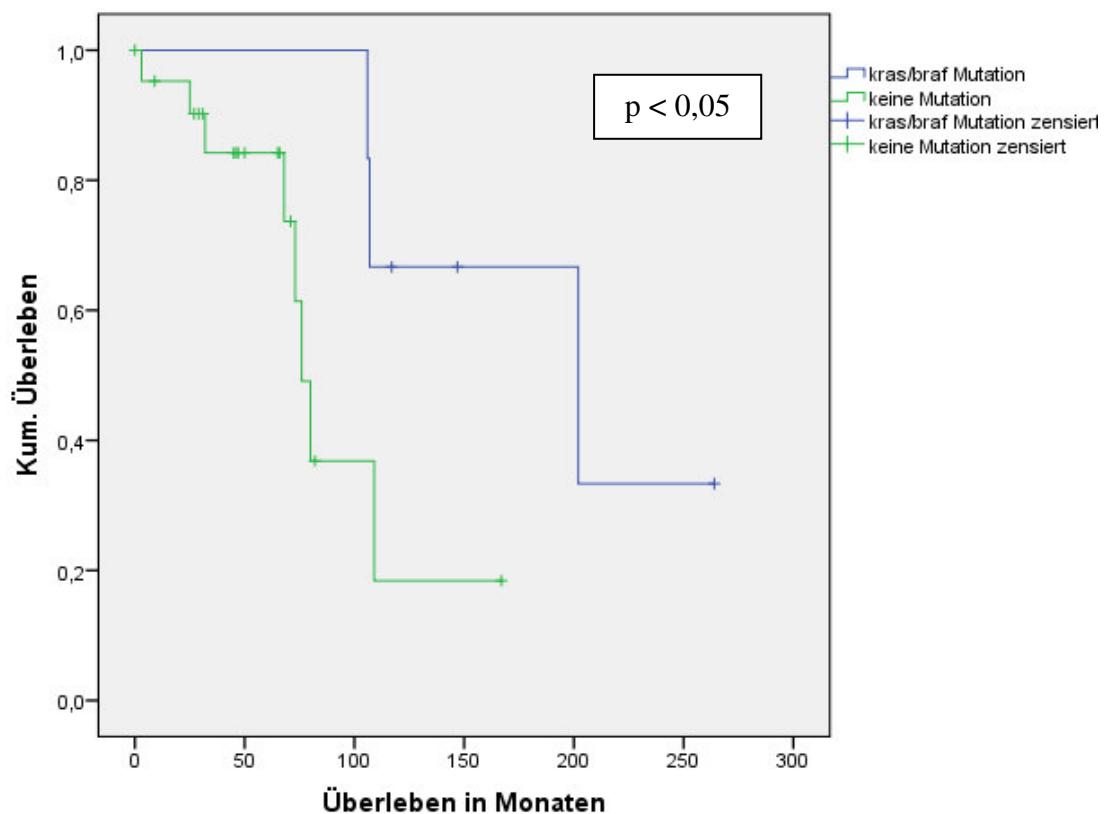
Lediglich bei einer der 48 Patientinnen kann eine *braf* Mutation eines serösen low-grade Karzinoms nachgewiesen werden, nämlich die c.1799T>A p.V600E (vgl. Abbildung 27).

Abbildung 27: *Braf* Mutation: c.1799T>A p.V600E, GAG



Die Patientin ist zum Zeitpunkt der Diagnose 19 Jahre alt, Überlebensdaten sind bei ihr leider nicht bekannt. Letzter Kontakt mit der Patientin ist 23 Monate nach der Operation. Zur Vervollständigung zeigt Abbildung 28 eine Kaplan-Meier Kurve, die das Überleben von Patientinnen ohne kras oder braf Mutation mit dem Überleben von Patientinnen mit einer dieser beiden Mutationen vergleicht. Auch hier zeigt sich, dass Patientinnen mit einer kras/braf Mutation signifikant länger überleben ($p = 0,044$).

Abbildung 28: Kaplan-Meier Überlebenskurve für Patientinnen mit kras/braf Mutation bzw. ohne kras/braf Mutation bei low-grade Ovarialkarzinomen



4.3 p53 Immunhistochemie

Von den 48 untersuchten low-grade Ovarialkarzinomen sind sechs Fälle (13 %) p53 stark positiv. Die genaue Aufteilung der Karzinome nach histologischem Typ und p53-Expression kann Tabelle 12 entnommen werden.

Tabelle 12: Kreuztabelle Immunhistochemie und histologischer Subtyp

	<i>Negativ</i> (0–1 %)	<i>Schwach positiv</i> (2–50 %)	<i>Stark positiv</i> (>50 %)	
Serös	17	11	5	33
Muzinös	6	0	0	6
Endometrioid	6	1	0	7
Klarzellig	0	1	1	2
	29	13	6	48

Ergebnisse für die serösen low-grade Karzinome: Im Schnitt sind die 17 p53 negativen Patientinnen bei Diagnose 54,5 Jahre alt und überleben 96,3 Monate, die elf schwach positiven 47,9 Jahre alt bei einem Überleben von 75,2 Monaten und die fünf stark positiven 56,4 Jahre bei einem Überleben von 166,4 Monaten. Der Log-Rank-Test bezüglich des Überlebens ergibt einen p Wert von 0,116, siehe Abbildung 29.

Ergebnisse für alle low-grade Karzinome: Aufgrund der geringen Fallzahl erhält man kein signifikantes Ergebnis im Log-Rank-Test ($p = 0,527$), siehe Abbildung 30.

Abbildung 29: Kaplan-Meier Überlebenskurve für p53 Immunhistochemie (I)

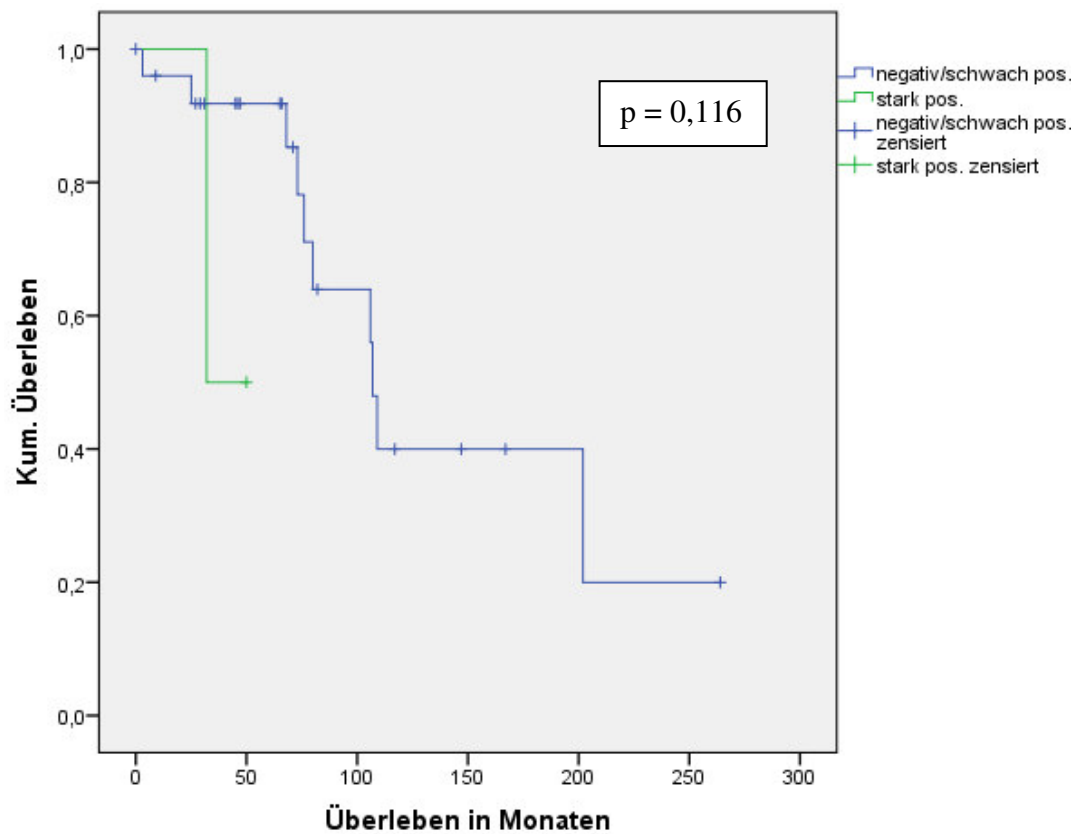
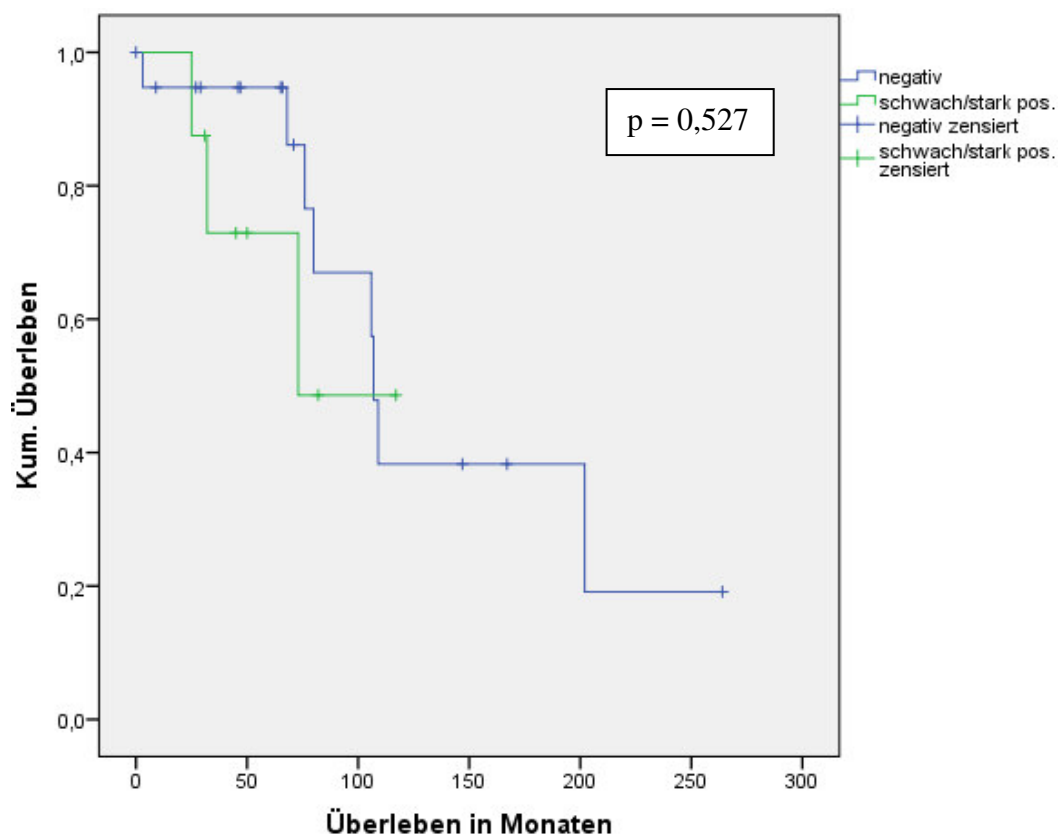


Abbildung 30: Kaplan-Meier Überlebenskurve für p53 Immunhistochemie (II)



5. Diskussion

Das Ovarialkarzinom ist einer der aggressivsten Tumore, seine Mortalität konnte trotz intensiver Forschung nicht wesentlich gesenkt werden. Auch wenn mit einer rückläufigen Zahl der Neuerkrankungen von 8000 auf 7200 Neuerkrankungen pro Jahr gerechnet werden kann, so bleibt das Ovarialkarzinom der zweithäufigste bösartige Tumor der weiblichen Geschlechtsorgane. Obwohl das relative 5-Jahres-Überleben nur ca. 40 % beträgt, ist im Moment ein generelles Screening nicht empfohlen. Studien können bislang das Nutzen der Vaginalsonographie und der regelmäßigen Kontrolle des Tumormarkers CA 125 nicht beweisen. Somit werden diese Vorsorgemaßnahmen, bis auf wenige Ausnahmen, auch weiterhin nicht von der Krankenkasse bezahlt (Kreienberg 2009).

Dementsprechend spät werden die meisten Ovarialkarzinome erkannt. Im fortgeschrittenen Stadium hilft oft nur noch eine radikale Operation zusammen mit einer aggressiven Chemotherapie. Die histologische Graduierung steht dabei oft im Hintergrund und scheint für einige Autoren nur für frühe Tumorstadien (FIGO I und II) oder für die Auswahl der Chemotherapie eine Rolle zu spielen (Diedrich 2007).

Trotz nicht bestehenden Graduierungssystems hat die Graduierung selbst bereits eine prognostische Signifikanz. Ein einheitliches Graduierungssystem könnte diese Signifikanz nochmals deutlich erhöhen und hätte für die Prognoseabschätzung und den daraus resultierenden Therapien eine sehr hohe Bedeutung. So existieren z. B. beim Mamma- oder Endometriumkarzinom bereits Systeme, die sowohl zuverlässig als auch prognostisch relevant sind. Beim Ovar hingegen konnte der Nutzen eines einzelnen Systems bislang noch nicht bewiesen werden (Mayr and Diebold 2000, Silverberg 2000).

Die WHO empfahl bis Ende 2013 die Graduierung nach einem dreistufigen System, im Laufe dieser Arbeit wurde 2014 das zweistufige System für seröse Tumoren festgelegt.

5.1 Diskussion der Graduierung

Aufgrund einiger Schwächen und der mangelnden Durchsetzungskraft des dreistufigen Systems war es Ziel dieser Arbeit, ein neues zweistufiges System zu untersuchen und mit dem bisher verwendeten System zu vergleichen.

Hauptaufgabe einer zuverlässigen Graduierung muss es sein, den Patientinnen eine ungefähre Prognose bezüglich ihres Überlebens mit der Krankheit anbieten zu können. Hier liegt das Hauptproblem des dreistufigen Systems. Von den 241 untersuchten Ovarialkarzinomen waren 109 Fälle als G2 Karzinome eingestuft worden, d.h. mit 45,2 % fast die Hälfte aller Patientinnen.

Wie man jedoch in Abbildung 17 erkennen kann, besitzen die meisten G2 Tumore jedoch einen ähnlichen Verlauf wie G3 Tumore, die mit einer schlechteren Prognose und einem kürzeren Überleben assoziiert sind. Die Kurven von G2 und G3 Karzinomen verlaufen fast nebeneinander und kreuzen sich mehrfach. Jedoch gibt es auch Patientinnen mit G2 Tumoren, die deutlich länger überleben als ihre Kolleginnen in der gleichen Gruppe und eher einen Verlauf wie G1 Tumore haben. Diese 28 low-grade G2 Karzinome waren bei Diagnosestellung acht Jahre jünger (54 vs. 62 Jahre) und lebten fast fünf Jahre länger (59 Monate) im Durchschnitt als die 81 high-grade G2 Karzinome (vgl. Abbildung 14) - ein Unterschied der durchaus relevant ist!

Dies bedeutet, dass eine bessere Einteilung der G2 Tumoren sowohl für eine exaktere Prognoseabschätzung als auch für die daraus resultierenden Therapien entscheidend ist.

Mit einem international einheitlich anzuwendenden zweistufigen Graduierungssystem mit einer scharfen Trennung von gut- und schlecht differenzierten Tumoren könnte somit einigen Patientinnen, falls man sie eher der G1 als der G3 Gruppe zuordnen kann, eine weniger intensive Chemotherapie bzw. Operation angeboten werden. Ein zweistufiges System wäre auch aus Sicht der Pathologie anzustreben, da die Graduierung durch eine Standardisierung vereinfacht wird und aufgrund der hohen Signifikanz den Patientinnen eine klarere Prognose angeboten werden kann.

Eine „Bauchentscheidung“ ist somit bei dem neuen zweistufigen System nicht mehr möglich, da es nur low- und high-grade Ovarialkarzinome gibt. Wie gut dieses Zweistufensystem mit dem Patientenalter und der Prognose korreliert, zeigen die Daten eigener Untersuchungen.

Die Anforderungen an ein neues Graduierungssystem sind hoch. Es muss einheitlich, reproduzierbar, leicht zu erlernen, prognostisch wegweisend und natürlich signifikanter als das bisherige System sein.

Wohingegen das System von Shimizu und Silverberg noch dreistufig aufgebaut ist und Architektur und Wachstumsmuster mit einbezieht, basiert das zweistufige System von Malpica lediglich auf der Pleomorphie der Kerne und Anzahl der Mitosen.

Die Reproduzierbarkeit wurde in zwei voneinander unabhängigen Durchgängen überprüft. Nach einer Pause von ca. drei Monaten zur ersten Graduierung wurden die Präparate

erneut eingestuft und zeigten mit einer Übereinstimmung von > 99 %, dass die Graduierung nach dem neuen System auch reproduzierbar ist.

Die Tatsache, dass das zweistufige System von Malpica prognostisch wegweisender und noch signifikanter ($p = 0,001$ vgl. zu $p = 0,01$) ist als das bisherige dreistufige System, konnte bereits gezeigt werden.

Das System von Shimizu und Silverberg ermöglicht eine Graduierung von fast allen histologischen Typen des Ovarialkarzinoms, lediglich bei klarzelligen Karzinomen ist dies nicht möglich. Malpica hingegen empfiehlt ihr System nur für seröse Ovarialkarzinome und ist somit in seiner Anwendungsmöglichkeit beschränkt.

Für die Graduierung von serösen Ovarialkarzinomen ist das zweistufige System deutlich signifikanter als das bisherige dreistufige ($p = 0,006$ bei Malpica, $p = 0,162$ bei Shimizu/Silverberg). Aufgrund der großen Fallzahl an serösen Präparaten ($n = 194$) und der hohen Signifikanz lässt sich doch mit Bestimmtheit sagen, dass bei diesem histologischen Subtyp das neue System von Malpica dem alten von Shimizu und Silverberg überlegen ist.

Die Reproduzierbarkeit bei serösen Präparaten war zudem 100 %, bei beiden Durchläufen wurden exakt die gleichen Graduierungsscores erzielt.

Bei muzinösen Karzinomen waren beide Systeme ähnlich signifikant ($p = 0,023$ bei Malpica, $p = 0,016$ bei Shimizu/Silverberg), jedoch wurden nach dem zweistufigen System zwei Präparate zu high-grade Karzinomen, die nach dem System von Shimizu und Silverberg als G1 Karzinome eingestuft worden waren. Da bei einer der zwei Patientinnen keine follow-up Daten vorliegen, ist es leider unmöglich zu beurteilen, welcher Grad besser zu den Tumoren passt. Da jedoch beide Patientinnen bei der Diagnosestellung unter 60 Jahre alt waren (51 und 59 Jahre) und eine der Patientinnen erst sechs Jahre danach daran verstarb, könnte man einen leichten Vorteil für das dreistufige System sehen.

Hauptgrund für die unterschiedlichen Graduierungsscores war die Schwierigkeit, einige Präparate aufgrund des Schleims bezüglich Kernmorphologie und Mitosenzahl richtig beurteilen zu können. (vgl. Abbildung 13).

Für die Graduierung von endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinomen liefert keines der beiden Graduierungssysteme ein signifikantes Ergebnis, was teilweise sicherlich an der zu geringen Fallzahl liegt.

Während die Graduierung bei endometrioiden Präparaten problemlos und einfach möglich ist, so zeigen klarzellige Ovarialkarzinome doch zytomorphologische Auffälligkeiten. Vier der neun Präparate besitzen abweichende Mitosenzahlen zur Kerngraduierung, d.h. Präparate die aufgrund ihrer Kernmorphologie eindeutig low- oder high-grade Karzinomen zugeordnet werden können, erfüllen nicht das zweite Kriterium der Mitosenzahl (weniger bzw. mehr als zwölf Mitosen pro 10 HPF), vgl. Abbildungen 12a und 12b. Dies kam zwar auch bei anderen histologischen Typen vor, allerdings nicht in solch einer Häufigkeit (44 %).

Um aber die Nützlichkeit bzw. die Alltagstauglichkeit des neuen zweistufigen Systems zur Graduierung von muzinösen, endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinomen abschließend beurteilen zu können, sind größere Studien mit höherer Fallzahl notwendig.

Letztendlich lässt sich dennoch sagen, dass das neue System leichter und schneller auf seröse und endometrioide Präparate anwendbar ist als auf muzinöse und klarzellige, bei denen die Beurteilung eines einzelnen Falles deutlich länger dauert und deutlich schwieriger ist. Dies führt langfristig zu einer schlechteren Reproduzierbarkeit. Endometrioide Karzinome des Ovars werden analog der Endometriumkarzinome graduiert, daher erscheint die bisher gültige Graduierung nach wie vor als sinnvoll.

In einer Studie mit 192 Patientinnen überprüften Mayr und Diebold das System von Shimizu und Silverberg. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass das System zwar signifikant sei, jedoch eine Graduierung mit weniger Eigenschaften ebenfalls prognostisch relevant sein könnte. Sie zeigten, dass sowohl die Kernmorphologie als auch die Mitosenanzahl alleine als prognostischer Faktor bereits signifikant waren (Mayr and Diebold 2000).

Dies lässt natürlich die Frage zu, ob Malpicas System nicht ebenfalls auf die Kerne reduziert werden könnte.

Dies muss entschieden mit ‚nein‘ beantwortet werden. Zwar erhält man ebenfalls ein hoch signifikantes Ergebnis ($p = 0,001$), jedoch spiegelt es nicht den Weg wider, wie es zustande kommt. Mitosen spielen für das zweistufige System eine untergeordnete Rolle, sind aber entscheidend bei unklaren Fällen. Ein Zitat aus Malpicas Vortrag in Leipzig

(Deutschland, 7. Mai 2011) fasst dies zusammen: „Cases with cytologic features difficult to assess; Perhaps more than moderate atypia, but not sure about severe atypia - Check mitotic index” (Malpica 2011).

Ist man sich bei der Kernmorphologie unschlüssig ob die Kerne doch eher zu low-grade Karzinomen passen oder doch schon high-grade Karzinomen ähnlich sind, so kann die Anzahl an Mitosen dem Pathologen die Entscheidung zu einem der beiden erleichtern. Deshalb muss ganz klar gesagt werden, dass Mitosen ein unverzichtbares Graduierungselement des zweistufigen Systems sind. Ausnahmen (vgl. Abbildung 12a und 12b), bei denen ein low-grade Karzinom 23 Mitosen aufweist, sind eher selten und sollten keinesfalls die Wichtigkeit der Mitosen in Frage stellen.

5.2 Diskussion der Tumorgenese

Wie schon zu Anfang gezeigt, stellen Ovarialkarzinome eine sehr heterogene Gruppe dar. Eine einfache Erklärung der Tumorgenese, wie man sie zum Beispiel von der Adenom-Karzinom Entwicklung beim Kolonkarzinom kennt, scheint es kausal für alle Ovarialkarzinom nicht zu geben.

Die Theorie der dualen Tumorgenese bezieht sich ausschließlich auf seröse Neoplasien. Es wird zwischen Typ I (low-grade) und Typ II Karzinomen (high-grade) unterschieden. Typ I Karzinome entstehen häufig schrittweise aus serösen Borderlinetumoren und weisen meist *braf*/*kras* Mutationen auf; Typ II hingegen ist charakterisiert durch chromosomale Instabilität und häufige *p53* Mutationen. Sie entstehen *de-novo*. Es wird zudem beschrieben, dass sowohl muzinöse Karzinome als auch muzinöse Borderline *kras*/*braf* Mutationen aufweisen (Mayr, Hirschmann et al. 2006, Staebler and Diebold 2007).

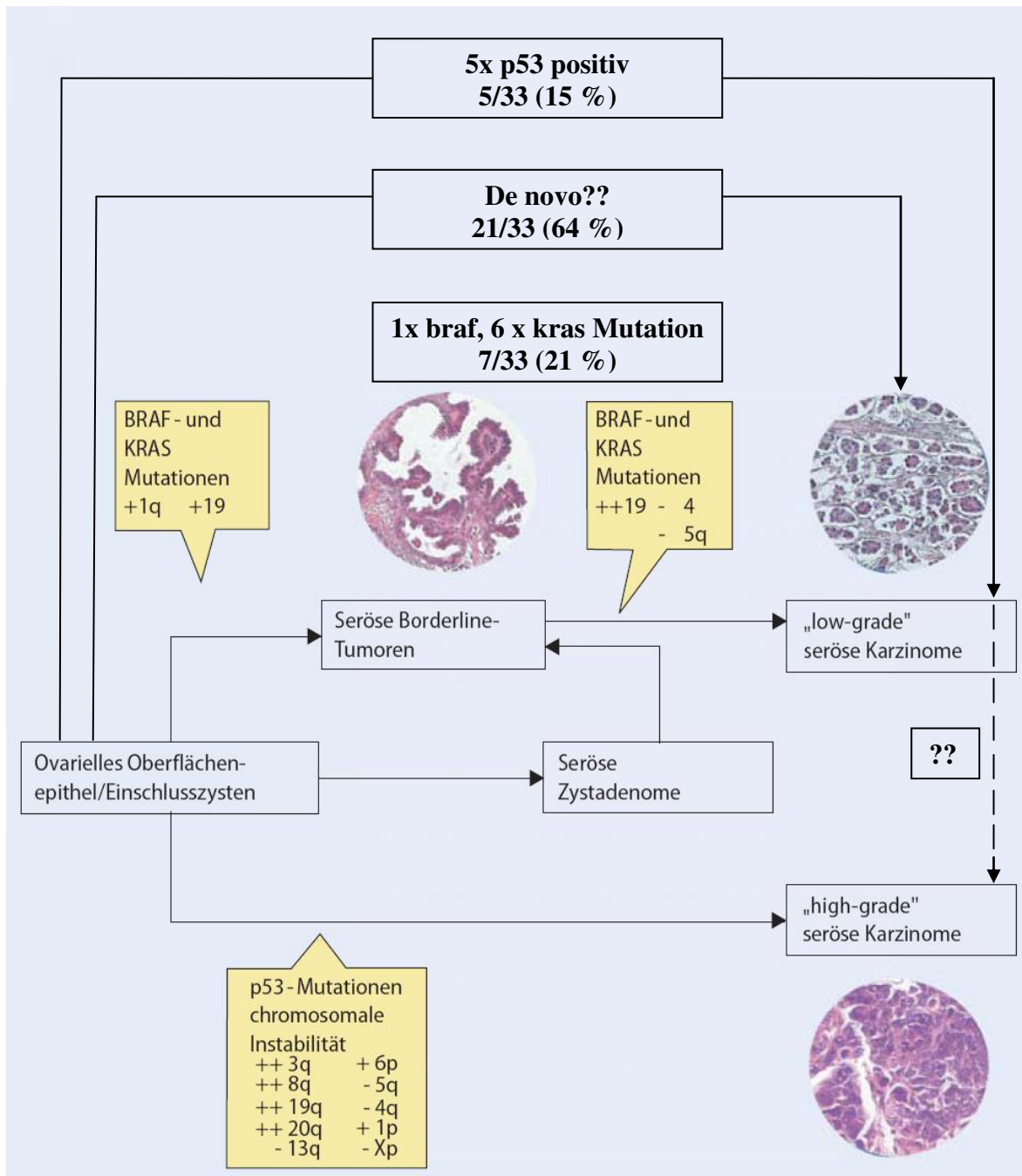
Von den initial 241 primären Ovarialkarzinomen, die nach dem zweistufigen System des MDACC graduiert wurden, sind 48 (20 %) low-grade und 193 (80 %) high-grade Karzinome. Überprüft man diese zwei Gruppen nun auf die Theorie der dualen Tumorgenese, kommt man zu folgenden Ergebnissen.

Mittels Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass 8 (17 %) der 48 Patientinnen eine *kras* und lediglich 1 (2 %) low-grade Karzinom eine *braf* Mutation aufwiesen. In der *p53* Immunhistochemie zeigten 6 (13 %) der 48 Fälle eine Überexpression, davon 4 ehemalige

G2 und 2 ehemalige G1 Tumore. Somit konnte bei 33 (69 %) low-grade Karzinomen weder eine kras/braf noch eine p53 Mutation detektiert werden.

Da das Mehrschrittmodell nur für seröse Neoplasien entworfen wurde, müssen die Ergebnisse somit auch abhängig von ihrem histologischen Subtyp betrachtet werden. So zeigten 6/33 (18 %) seröse low-grade Ovarialkarzinome eine kras Mutation, 1/33 (3 %) eine braf und 5/33 (15 %) eine p53 Mutation. Somit hatten lediglich 7/33 (21 %) der serösen low-grade Karzinome eine kras/braf Mutation, in 21/33 (64 %) konnte weder eine kras/braf noch eine p53 Mutation festgestellt werden. Um dies zu verdeutlichen, wurde das Mehrschrittmodell der Tumorgenese von Diebold in Abbildung 31 um diese „neuen“ Wege erweitert.

Abbildung 31: Nach Diebold erweitertes Modell der Tumorgenese (Staebler and Diebold 2007)



Es wäre sicherlich nicht richtig, das bisherige Modell als falsch zu bezeichnen. Allerdings zeigen die in dieser Arbeit erbrachten Daten, dass das Modell erweitert werden muss.

Unstrittig ist, dass ein gewisser Teil der serösen low-grade Karzinome aus serösen Borderlinetumoren entsteht. Sie weisen ebenfalls kras/braf Mutationen auf – Mutationen die in Borderlinetumoren sehr häufig auftreten (Mayr, Hirschmann et al. 2006). Diese Patientinnen sind nicht nur jünger, sondern überleben im Vergleich zu Patientinnen ohne kras/braf Mutation auch signifikant länger $p < 0,05$ (vgl. Abbildung 25).

Aufgrund der Ergebnisse eigener Untersuchungen der serösen low-grade Karzinome kann davon ausgegangen werden, dass andere, bisher nicht nachgewiesene Mutationen vorliegen.

Ebenso widersprüchlich zur dualen Tumorgenese ist die häufige p53-Überexpression, die typischerweise bei den high-grade Karzinomen, nicht aber bei den low-grade Karzinomen auftritt. So weisen 15 % der serösen low-grade Karzinome eine p53 Mutation auf. Dies lässt natürlich die Vermutung zu, dass zumindest ein Teil der low-grade Karzinome mit dieser Mutation in high-grade Karzinomen übergehen können. Ob eine p53 Mutation mit einem schlechteren Outcome einhergeht konnte in dieser Arbeit nicht ausreichend geklärt werden. Hierzu sind weitere Studien mit einem größeren Patientenkollektiv notwendig. Ebenso muss überprüft werden, ob eine fehlende p53-Überexpression auch einer fehlenden p53-Mutation entspricht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass seröse low-grade Ovarialkarzinome offenbar sowohl de-novo als auch schrittweise aus Borderlinetumoren entstehen können. Ob seröse low-grade Karzinome mit p53 Mutationen nur eine Zwischenstufe zum high-grade Karzinom sind konnte nicht geklärt werden und Bedarf weiterer Abklärung. Ebenso müssen in weiteren Studien die high-grade Karzinome auf kras/braf/p53 Mutationen hin untersucht werden um weitere Rückschlüsse ziehen zu können und das Modell gegebenenfalls zu erweitern. Die Tatsache, dass low-grade Karzinome ohne braf/kras aber mit p53 Mutation existieren, spricht für die Existenz einer Subgruppe von p53 mutierten Fällen, die entgegen der allgemeinen Annahme nicht automatisch einem high-grade Karzinom entsprechen.

Bisher wurde nur auf seröse low-grade Karzinome eingegangen, aber auch muzinöse und endometrioidale low-grade Karzinome zeigten *kras* Mutationen (je 17 %). In der Literatur ist dieses Phänomen bereits bekannt und wird durch die schrittweise Tumorphase bei muzinösen und endometrioiden Karzinomen begründet. Spezifische Kinasehemmer zur Hemmung der kontinuierlichen Aktivierung der MAP-Kinase Signalkaskade werden bereits getestet (Staebler and Diebold 2007). Die p53 Mutation des klarzelligen low-grade Karzinoms kann aufgrund der zu geringen Fallzahlen nur beschrieben werden und lässt keine Aussagen über Häufigkeiten zu.

Mutationsanalysen beim Ovarialkarzinom dienen nicht nur als Ergänzung zur histopathologischen Graduierung, sondern sie sind auch im klinischen Alltag wichtig. Dadurch kann die Therapie individuell an den spezifischen Tumor der Patientin angepasst werden. Mithilfe immunohistochemischer Untersuchungen, z. B. von p16, p53 oder des Ki-67 Proliferationsindex, können Diagnosen gesichert werden. Man geht davon aus, dass sowohl p16 als auch der Ki-67 Proliferationsindex bei high-grade Ovarialkarzinomen erhöht sind (Diaz-Padilla, Malpica et al. 2012). Auch wenn diese Indizes momentan alleine noch keine Aussagekraft besitzen, so müssen weitere Studien klären, ob eine Kombination dieser Indizes eventuell Rückschlüsse auf die Tumorgenese der Neoplasie zulässt.

Für die operative Therapie von Ovarialkarzinomen spielt in der Klinik der Unterschied zwischen einem low-grade und high-grade Karzinom nur eine untergeordnete Rolle. Ziel ist stets die R0-Resektion, meist gefolgt von einer Chemotherapie. Zweifellos ist auch für alle low-grade Ovarialkarzinome die optimale Therapie eine R0-Resektion. Die Wirksamkeit einer postoperativen Chemotherapie ist aber vermutlich, wie auch bei anderen gut differenzierten Tumoren deutlich geringer. Dies sollte in der Therapieplanung berücksichtigt werden. Daher ist die Graduierung nicht nur für die Prognoseabschätzung sondern vermutlich auch für den postoperativen Therapieerfolg von Bedeutung. Allerdings stellt sich die Frage, ob man Patientinnen mit einem low-grade Karzinom nicht eine molekularpathologisch/tumorspezifische Chemotherapie anbieten könnte. Aktuelle Studien liefern hierfür positive Ergebnisse bezüglich einer Therapie mit Selumetinib, einem selektiven Inhibitor der MAP Kinase MEK 1/2. In einer 2013 von Farley und Kollegen veröffentlichten Phase 2 Studie, die sich ausschließlich auf seröse low-grade Ovarialkarzinome bezieht, konnte gezeigt werden, dass Selumetinib bei 15 % der Patientinnen eine Tumorregression und bei weiteren 65 % zumindest ein Fortschreiten des

Tumors verhindern konnte (Farley, Brady et al. 2013). Auch andere Autoren sehen in Selumetinib ein wirksames Medikament für Patientinnen mit kras/braf mutiertem Ovarialkarzinom (Mahner und Pfisterer 2013).

Andere Behandlungsmethoden, die in den Fokus rücken, wie z.B. die Therapie mit dem monoklonalem Antikörper Bevacizumab, der die Angiogenese des Tumors hemmen soll, zeigen ebenfalls zunehmend Erfolge (Qing Ye 2013, Bevacizumab in the treatment of ovarian cancer). Inwiefern eine Therapie mit AMG 479, einem anti-IGF-1R Antikörper, Patientinnen mit low-grade Ovarialkarzinomen helfen kann, untersuchen momentan laufende Studien (Diaz-Padilla, Malpica et al. 2012).

Aufgrund neuer Behandlungsmethoden beim Ovarialkarzinom kann man sagen, dass die Tumorgenese eine zunehmend wichtige Rolle auch für die Therapie der Patientinnen einnimmt. Obwohl immer noch Lücken und Unklarheiten bezüglich der Tumorgenese – sowohl beim low- als auch high-grade Ovarialkarzinom und den verschiedenen histologischen Subtypen - bestehen, so rücken alternative Therapien zur bisherigen Standardchemotherapie in den Vordergrund.

Ziel weiterer Untersuchungen muss sein, eine exakte molekulare Subklassifikation der Ovarialkarzinome zu erreichen, somit das Schema des dualen Tumorgeneseweges weiter zu ergänzen und damit eine patientenorientierte Therapie und Prognose zu ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist nach dem Endometriumkarzinom der zweithäufigste bösartige Tumor der weiblichen Geschlechtsorgane und zugleich einer der aggressivsten. In der westlichen Welt ist dieser Tumor noch heute die tödlichste gynäkologische Erkrankung.

Im Gegensatz zu anderen gynäkologischen Karzinomen, wie z. B. dem Mammakarzinom, gibt es beim Ovarialkarzinom noch kein adäquates Graduierungssystem, mit dem eine zuverlässige Prognose für Patientinnen gestellt werden kann. Ziel der Arbeit ist es zu klären, ob das neue zweistufige System von Anais Malpica (MDACC), das bisher nur zur Graduierung von serösen Ovarialkarzinomen verwendet wird, dem bisherigen dreistufigen System von Shimizu und Silverberg überlegen ist. Problem des dreistufigen Systems ist die große Gruppe an G2 Tumoren, deren Prognoseabschätzung mit diesem System nicht gelingt. In einem zweiten Schritt soll dann die Bedeutung der Ergebnisse bezüglich der bisherigen Theorie der dualen Tumorgenese bewertet werden. Diese besagt, dass seröse Karzinome auf zwei unterschiedlichen Wegen entstehen. Typ I Karzinome (sog. low-grade Karzinome) entstehen schrittweise aus serösen Borderlinetumoren und weisen meist kras/braf Mutationen auf, Typ II Karzinome (sog. high-grade Karzinome) hingegen entstehen de-novo und sind charakterisiert durch p53 Mutationen.

In zwei unabhängigen Durchgängen wurden 241 primäre Ovarialkarzinome, bei denen bereits Graduierungsscores nach dem alten dreistufigen System existierten, mit dem neuen System re-graduiert und die Ergebnisse miteinander verglichen. Das zweistufige System bewertet als primäres Kriterium die Kerne der Zellen (einheitlich bzw. deutliche Variationen) und als sekundäres Kriterium die Anzahl der Mitosen am zytologisch auffälligsten Tumorabschnitt des Präparates (<13 bzw. \geq zwölf Mitosen pro 10HPF). Somit werden die Tumore in low- bzw. high-grade Ovarialkarzinome eingeteilt.

Bei allen low-grade Ovarialkarzinomen wurde anschließend eine p53 Immunhistochemie und kras/braf Mutationsanalysen durchgeführt.

48 (20 %) der 241 Fälle ergaben low-grade und 193 (80 %) high-grade Ovarialkarzinome. Die Aufteilung der ehemaligen G2 Karzinome erfolgte in 26 % low- und 74 % high-grade. Die Korrelation zwischen Tumorgraduierung und Überleben beträgt $p = 0,001$ für das zweistufige und $p = 0,01$ für das dreistufige System – nur für seröse Ovarialkarzinome betrachtet $p = 0,006$ bzw. $p = 0,162$.

Von den 48 low-grade Ovarilakarzinomen wiesen acht eine kras Mutation, eins eine braf Mutation und sechs eine p53 Überexpression, entsprechend einer p53 Mutation, auf. 33 der 48 Patientinnen zeigten keine Mutation.

Das zweistufige System von Malpica ist einfach zu erlernen, einfach anzuwenden, reproduzierbar (Übereinstimmung >99 %) und noch signifikanter als das dreistufige System. Ob es auch für muzinöse, endometrioide und klarzellige Ovarialkarzinome angewandt werden kann, müssen größere Fallstudien zeigen.

Das momentan bestehende Modell des dualen Weges der Tumorgenese muss um weitere Wege ergänzt werden. So zeigten nur 21 % der serösen low-grade Karzinome eine braf oder kras Mutation. Sowohl die häufige, nicht erwartete p53-Überexpression (15 %) als auch die große Anzahl an bisher noch nicht nachgewiesenen Mutationen (64%) bei low-grade Karzinomen sprechen für weit komplexere Tumorentstehungswege als bisher angenommen.

Erste Erweiterungen bzw. neue Einteilungen sind in die aktuelle WHO-Klassifikation bereits eingegangen. Nur die konsequente andauernde Ergänzung und Verbesserung von Klassifikationen kann den Patienten gerecht werden und ihnen eine auf sie zugeschnittene Therapie und Prognoseabschätzung gewährleisten.

7. Anhang: Low-grade Karzinome (nach Malpica)

Fallnr.	Alter	FIGO	Mitos.	SSG	Histo	Überl..	Kras	Braf	p53
1	54	3	1	1	1	*	4	1	2
2	61	3	3	2	1	80	4	1	1
3	56	1	12	2	1	76	4	1	1
4	33	3	1	2	1	50	4	1	3
5	59	3	3	2	1	29	4	1	1
6	66	3	8	1	1	32	4	1	3
7	60	3	2	2	1	3	4	1	1
8	77	1	4	1	2	47	4	1	1
9	63	1	11	1	2	71	4	1	1
10	46	1	3	1	1	264	3	1	1
11	19	1	1	1	1	*	4	2	2
12	56	1	7	1	1	*	4	1	3
13	35	1	2	1	1	*	4	1	1
14	65	1	10	1	1	147	2	1	1
15	61	1	8	1	2	106	3	1	1
16	50	1	5	1	3		4	1	1
17	87	1	3	1	2	27	4	1	1
18	66	1	3	1	1	*	4	1	1
19	62	1	6	1	1	66	4	1	1
20	72	1	2	2	1	31	4	1	2
21	62	1	5	2	1	*	4	1	3
22	72	1	9	1	3	82	4	1	2
23	61	1	1	2	4	*	4	1	2
24	76	3	5	2	1	117	3	1	2
25	56	2	3	2	1	202	2	1	1
26	64	3	10	2	1	65	4	1	1
27	65	3	7	2	1	*	4	1	3
28	51	3	1	2	1	46	4	1	1
29	41	2	12	2	3	*	4	1	1
30	77	2	2	2	2	9	4	1	1
31	76	1	2	1	2	167	4	1	1
32	56	3	2	1	1	25	4	1	2
33	64	1	9	2	3	68	4	1	1
34	57	3	1	1	1	*	4	1	1
35	35	2	7	2	4	*	4	1	3
36	61	1	12	2	3	*	4	1	1
37	26	3	3	2	1	*	4	1	1
38	47	2	6	2	1	*	1	1	2
39	31	2	2	1	1	*	4	1	2
40	42	1	2	2	1	*	4	1	2
41	73	1	4	1	3	*	1	1	1
42	50	1	12	2	1	*	4	1	1
43	52	2	23	2	1	107	2	1	1
44	58	3	5	2	3	109	4	1	1

45	73	3	3	2	1	*	4	1	2
46	35	2	2	2	1	45	4	1	2
47	61	3	1	2	1	0	4	1	1
48	22	3	5	2	1	73	4	1	2

Legende:

Alle 48 low-Grade Ovarialkarzinome (nach Malpica)

Alter: in Jahren

SSG: Graduierung nach Dreistufen-System von Silverberg

Histo: 1 = serös, 2 = muzinös, 3 = endometrioid, 4 = klarzellig

Überleben: in Monaten; * bei letztem Kontakt noch am Leben

Kras Mut.: 1 = c.35G>A p.G12D (Aspartat), 2 = c.35G>C p.G12A (Alanin),
3 = c.35G>T p.G12V (Valin), 4 = keine Mutation

Braf Mut.: 1 = keine Mutation, 2 = Braf c.1799T>Ap.V600E

p53 IHC: 1 = negativ (0-1 %), 2 = schwach positiv (2-50 %), 3 = stark positiv (>50 %)

8. Danksagung

Frau Prof. Dr. med. Doris Mayr danke ich für die engagierte Hilfe bei der Durchführung der Arbeit und für die herausragende Betreuung. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung danke ich für die Beratung bei allen molekularpathologischen Fragen und für die Koordination des Laborteils. Frau Martina Brand und Alexandra Schindler danke ich für die Unterstützung bei Fragen im Labor. Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen, die mich bei Durchführung und Ausarbeitung der Studie unterstützt haben und hier nicht genannt wurden.

9. Lebenslauf

- Name: Hartmann, Sebastian Franz
- Nationalität: Deutsch
- Ausbildung: 2 Jahre Vorklinik an der LMU München
(Oktober 2008 – Oktober 2010)

Physikum (August 2010)

3 Jahre Klinischer Teil an der LMU München
(Oktober 2010 – Oktober 2013)

Praktisches Jahr an der TU München
(Oktober 2013-Oktober 2014)

Staatsexamen an der TU München
(Oktober 2014)

10. Literaturverzeichnis

- Baak, J. P., et al. (1987). "Prognostic factors in borderline and invasive ovarian tumors of the common epithelial type." Pathol Res Pract **182**(6): 755-774.
- Baak, J. P., et al. (1987). "The prognostic variability of ovarian tumor grading by different pathologists." Gynecol Oncol **27**(2): 166-172.
- Baak, J. P., et al. (1986). "Morphometric data to FIGO stage and histological type and grade for prognosis of ovarian tumours." J Clin Pathol **39**(12): 1340-1346.
- Bässler, R. (1997). Weibliches Genitale, Mamma, Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen, Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen, Tumoren des Kindesalters, endokrine Organe
155 Tabellen.
- Bertelsen, K., et al. (1993). "Reproducibility and prognostic value of histologic type and grade in early epithelial ovarian cancer." Int J Gynecol Cancer **3**(2): 72-79.
- Bichel, P. and A. Jakobsen (1989). "A new histologic grading index in ovarian carcinoma." Int J Gynecol Pathol **8**(2): 147-155.
- Dehari, R., et al. (2007). "The development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis." Am J Surg Pathol **31**(7): 1007-1012.
- Diaz-Padilla, I., et al. (2012). "Ovarian low-grade serous carcinoma: a comprehensive update." Gynecol Oncol **126**(2): 279-285.
- Diedrich, K. (2007). Gynäkologie und Geburtshilfe
mit 97 Tabellen ; [völlig neu mit Fallquiz]. Heidelberg, Springer.
- Farley, J., et al. (2013). "Selumetinib in women with recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum: an open-label, single-arm, phase 2 study." Lancet Oncol **14**(2): 134-140.
- Feeley, K. M. and M. Wells (2001). "Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy." Histopathology **38**(2): 87-95.
- FIGO (1971). "Classification and staging of malignant tumours in the female pelvis." Acta Obstet Gynecol Scand **50**(1): 1-7.
- Geisler, et al. (1998). "Nuclear shape: An independent predictor of survival in patients with ovarian carcinoma." International Journal of Gynecological Cancer **8**(2): 164-167.
- Gershenson, D. M., et al. (2006). "Clinical behavior of stage II-IV low-grade serous carcinoma of the ovary." Obstet Gynecol **108**(2): 361-368.

- Haapasalo, H. (1991). "Prognostic factors in ovarian carcinoma. A clinicopathologic study with special reference to mitotic counts, nuclear morphometry and DNA cytometry." Acta Obstet Gynecol Scand **70**(4-5): 397.
- Haapasalo, H., et al. (1990). "Prognostic value of ovarian carcinoma grading methods--a method comparison study." Histopathology **16**(1): 1-7.
- Kaufmann, M. (2006). Die Gynäkologie mit 197 Tabellen. Heidelberg, Springer.
- Kindelberger, D. W., et al. (2007). "Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship." Am J Surg Pathol **31**(2): 161-169.
- Kreienberg, R. (2009). Management des Ovarialkarzinoms interdisziplinäres Vorgehen ; mit 90 Tabellen. Heidelberg, Springer.
- Kurman, R. J. and M. Shih Ie (2010). "The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory." Am J Surg Pathol **34**(3): 433-443.
- Mahner, S. and J. Pfisterer (2013). "Towards individualised treatment in ovarian cancer." Lancet Oncol **14**(2): 101-102.
- Malpica, A. (2011). Ovarian High Grade Serous Carcinoma, from Pathogenesis to Prognosis, and Anything in Between Leipzig.
- Malpica, A., et al. (2004). "Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system." Am J Surg Pathol **28**(4): 496-504.
- Malpica, A., et al. (2007). "Interobserver and intraobserver variability of a two-tier system for grading ovarian serous carcinoma." Am J Surg Pathol **31**(8): 1168-1174.
- Mayr, D. and J. Diebold (2000). "Grading of ovarian carcinomas." Int J Gynecol Pathol **19**(4): 348-353.
- Mayr, D., et al. (2006). "KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: A comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants." Gynecol Oncol **103**(3): 883-887.
- McCluggage, W. G. (2008). "My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas." J Clin Pathol **61**(2): 152-163.
- O'Neill, C. J., et al. (2005). "An immunohistochemical comparison between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: significantly higher expression of p53, MIB1, BCL2, HER-2/neu, and C-KIT in high-grade neoplasms." Am J Surg Pathol **29**(8): 1034-1041.
- Pan, S. Y., et al. (2004). "A case-control study of diet and the risk of ovarian cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **13**(9): 1521-1527.
- Robert Koch Institut (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008. Berlin, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft

der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. .

Roth, L. M. (2007). "Two-tier grading system for ovarian epithelial cancer: has its time arrived?" Am J Surg Pathol **31**(8): 1285-1287.

Schmalfeldt, B. (2007). Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren [forschen, lehren, heilen]. München [i.e.] Germering [u.a.], Zuckschwerdt.

Seidman, J. D., et al. (2006). "Testing of two binary grading systems for FIGO stage III serous carcinoma of the ovary and peritoneum." Gynecol Oncol **103**(2): 703-708.

Shih Ie, M. and R. J. Kurman (2004). "Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis." Am J Pathol **164**(5): 1511-1518.

Shimizu, Y., et al. (1998). "Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up." Cancer **82**(5): 893-901.

Shimizu, Y., et al. (1998). "Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. I. Prognostic significance of histopathologic features--problems involved in the architectural grading system." Gynecol Oncol **70**(1): 2-12.

Silva, E. G. and D. M. Gershenson (1998). "Standardized histologic grading of epithelial ovarian cancer: elusive after all these years." Gynecol Oncol **70**(1): 1.

Silverberg, S. G. (2000). "Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal." Int J Gynecol Pathol **19**(1): 7-15.

Staebler, A. and J. Diebold (2007). "Molekularpathologie der epithelialen Ovarialneoplasien." Der Pathologe **28**(3): 180-186.

TA Longacre, M Wells (2014): "Classification of tumours of the ovary, fallopian tube and primaryperitoneal carcinoma in WHO classification of tumours of the female reproductive organs, 4th edition." Ed. RJ Kurman, ML Carcangiu, CS Herrington, RH Young. Lyon 2014.

Tumorregister München (2013). "Basis-Statistiken C56: Ovarialtumor ".

Tumorregister München (2013). "Relatives Überleben für Patienten mit Ovarialtumor nach FIGO."

Yang, H. P., et al. (2011). "Ovarian cancer risk factors by histologic subtypes in the NIH-AARP diet and health study." Int J Cancer.

Eidesstattliche Versicherung

Hartmann, Sebastian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Anwendung eines neuen Tumorgraduierungssystems bei Ovarialkarzinomen und Überprüfung der molekularen Relevanz: Retrospektive Untersuchung an einem großen Patientenkollektiv mit Korrelation zu klinischen Daten sowie zum Überleben

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Neumarkt, 24.12.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand